

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Тульский государственный университет»

Естественнонаучный институт
Кафедра «Химии»

Утверждено на заседании кафедры Химия
«30» января 2023 г., протокол № 6

Заведующий кафедрой



В.А. Алферов

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
по выполнению лабораторных работ
по дисциплине (модулю)**

«Ионообменная хроматография»

**основной профессиональной образовательной программы
высшего образования – программы магистратуры**

по направлению подготовки
18.04.01 Химическая технология

с направленностью (профилем)
Технология органического синтеза

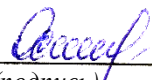
Форма обучения: очная

Идентификационный номер образовательной программы: 180401-01-23

Тула 2023 год

Разработчик методических указаний

Осина К.В., доцент, к.х.н.
(ФИО, должность, ученая степень, ученое звание)


(подпись)

Оглавление

Введение	6
Глава 1. Хроматография.	7
Определение.....	7
Классификация хроматографических методов	9
Способы получения хроматограмм.....	11
Хроматографические параметры.....	13
Теория хроматографического разделения.	17
Теория теоретических тарелок	19
Кинетическая теория хроматографии	23
Оценка размывания хроматографической полосы	27
Селективность и разрешение	30
Хроматографическая аппаратура и обработка хроматограмм	34
Схема хроматографа.....	34
Общие сведения о детекторах.....	35
Общий подход к выбору детектора.	38
Анализ и методы расчета хроматограмм.....	39
Качественный анализ.	39
Количественный анализ.....	43
Методы расчета хроматограмм.	44
Достоверность результатов и источники погрешностей	47
Газовая хроматография.....	48
Газожидкостная хроматография.....	49
Неподвижные жидкие фазы.	49
Носители неподвижных жидких фаз.....	51
Особенности газовых хроматографов	51
Жидкостная колоночная хроматография.....	53
Адсорбционная хроматография	55
Подвижные фазы.	56
Особенности жидкостных хроматографов	59
Ионообменная хроматография	60
Терминология и принципы разделения ионов в сорбционных процессах	60
Ионный обмен.....	61
Образование ионных пар	62

Ионная эксклюзия	62
Ионообменные равновесия.....	63
Неподвижные фазы (сорбенты) в ионной хроматографии	66
Практика выбора сорбентов и критерии их качества	68
Анионо- и катионообменники.....	76
Подвижные фазы (элюенты) в ионной хроматографии	81
Анионная хроматография	82
Катионная хроматография.....	87
Капиллярный электрофорез	90
Варианты капиллярного электрофореза	94
Капилляры для разделения	96
Введение проб.....	97
Детектирование.....	98
Плоскостная хроматография	102
Гель-хроматография.....	106
Глава 2.Лабораторный практикум	108
Лабораторная работа №1. Определение полной динамической обменной емкости (ПДООЕ) ионитов	108
Лабораторная работа № 2. Равновесие ионного обмена.....	116
Лабораторная работа № 3. Определение нитрата натрия в растворе методом ионного обмена	128
Лабораторная работа №4. Газохроматографический метод определения содержания токсичных микропримесей	134
Лабораторная работа № 5. Определение нефтепродуктов (на примере гексадекана) в ростовых средах методом газовой хроматографии	144
Лабораторная работа №6. Измерение массовой концентрации углеводов в напитках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии	149
Лабораторная работа № 7. Разделение смеси белков методом ионообменной хроматографии	158
Лабораторная работа № 8. Обессоливание белкового раствора методом эксклюзионной хроматографии	165
Лабораторная работа № 9. Разделение смеси ферроценов методом тонкослойной хроматографии.	171

Лабораторная работа № 10. Определение содержания анионов в воде методом капиллярного электрофореза.....	175
Лабораторная работа № 11. Определение содержания катионов в воде методом капиллярного электрофореза.....	189
Лабораторная работа № 12. Определение массовой концентрации бенз(а)пирена в воде методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.....	202
Рекомендуемая литература.....	219

Введение

Хроматографические методы являются универсальными методами разделение компонентов. Они позволяют разделить близкие по свойствам органические и неорганические вещества, например, катионы одной группы металлов, смеси органических соединений гомологического ряда. Данные методы находят широкое применение в науке и технике, так как в результате хроматографического разделения веществ можно провести качественное и количественное разделение их без трудоемких дополнительных операций.

Ионообменные материалы находят широкое применение в различных отраслях народного хозяйства и научных исследованиях для очистки веществ, извлечения веществ из растворов и их концентрирования, разделения смесей, анализа и т.д. Достаточно упомянуть водоподготовку, промышленность делящихся материалов, гидрометаллургию.

В данном методическом пособии приведен ряд практических работ, выполнение которых будет способствовать освоению приемов экспериментальной работы с хроматографическим оборудованием и ионообменными материалами. Основное направление этих работ – получение физико-химических характеристик ионитов, изучение особенностей процессов ионного обмена и хроматографии, знание которых необходимо для подбора условий практического применения.

Описанию каждой лабораторной работе предшествует краткое теоретическое введение. Для более подробного знакомства с теоретическим материалом можно использовать рекомендованную литературу, указанную в конце пособия.

Глава 1. Хроматография.

Определение

Хроматография - это физико-химический метод разделения и определения веществ, основанный на распределении компонентов между двумя фазами, неподвижной и подвижной. Неподвижной (стационарной) фазой служит твердое пористое вещество (часто его называют сорбентом) или пленка жидкости, нанесенная на твердое вещество. Подвижная фаза представляет собой жидкость или газ, протекающий через неподвижную фазу.

Компоненты анализируемой смеси вместе с подвижной фазой передвигаются вдоль стационарной фазы. Ее обычно помещают в стеклянную (или металлическую) трубку, называемую колонкой. В зависимости от силы взаимодействия с поверхностью сорбента (за счет адсорбции или по какому-либо еще механизму) компоненты будут перемещаться вдоль колонки с разной скоростью. Одни компоненты останутся в верхнем слое сорбента, другие, с меньшей степенью взаимодействия с сорбентом, окажутся в нижней части колонки, а некоторые и вовсе покинут колонку вместе с подвижной фазой. Таким образом, происходит быстрое разделение сложных смесей компонентов. Например, за 40 мин можно разделить и определить 18 аминокислот (рисунок 1).

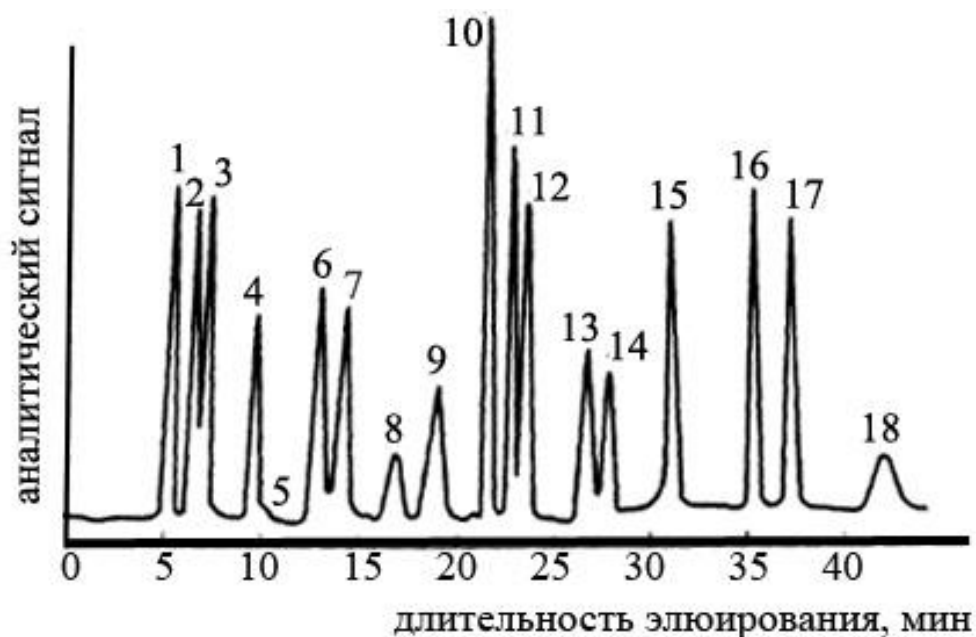


Рисунок 1. Хроматограмма искусственной смеси аминокислот, входящих в состав продуктов гидролиза белков:

1 — аспарагиновая кислота; 2 — треонин; 3 — серин; 4 — глутаминовая кислота; 5 — пролин; 6 — глицин; 7 — аланин; 8 — цистин; 9 — валин; 10 — метионин; 11 — изолейцин; 12 — лейцин; 13 — тирозин; 14 — фенилаланин; 15 — гистидин; 16 — лизин; 17 — аммиак; 18 — аргинин (диаметр колонки 1,75 мм; ионообменник — дуррум C-A4 (8 мкм); проба — 10 нмоль смеси; скорость потока 6—10 мл/ч, давление 83,5 атм)

Хроматография - динамический процесс. При перемещении вдоль колонки подвижная фаза встречает на своем пути все новые слои сорбента, что обеспечивает многократность актов сорбции-десорбции разделяемых компонентов. Этим обусловлена значительно большая эффективность хроматографического разделения по сравнению со статическими методами сорбции и экстракции.

Хроматография - гибридный метод анализа, в котором хроматографический процесс является частью общей аналитической системы, сочетающей разделение и измерение. Метод позволяет не только разделять многокомпонентную смесь, но и идентифицировать и определять ее коли-

чественный состав. Поэтому детектирование сигнала (а также запись и обработка его) занимает важное место.

Начало хроматографии положено русским ботаником М.С. Цветом в 1903 году, который для разделения растительных пигментов использовал колонку, заполненную карбонатом кальция. Расцвет метода начинается с 1931 г. (работы Куна, Ледерера и Винтерштейна по анализу каротина растительного происхождения). Особенно бурно метод развивается после работ Мартина и Синджа (1952 г.), удостоенных Нобелевской премии за существенный вклад в теорию метода. Гигантский скачок в развитие метода приходится на 60-е годы, когда появились новые приборы, сочетающие разделительную колонку с проточным детектором, непрерывно фиксирующим концентрацию компонентов смеси.

Классификация хроматографических методов

В основу общепринятых классификаций многочисленных хроматографических методов положены следующие признаки:

- агрегатное состояние применяемых фаз,
- механизм взаимодействия сорбент - сорбат,
- форма слоя сорбента (техника выполнения),
- цель хроматографирования.

По агрегатному состоянию фаз хроматографию разделяют на газовую и жидкостную. Газовая включает газо-жидкостную и газотвердофазную. Жидкостная хроматография подразделяется на жидкость-жидкостную, жидкость-твердофазную и жидкость-гелевую. Первое слово в названии метода характеризует агрегатное состояние подвижной фазы, второе - неподвижной. Часто жидкая неподвижная фаза закреплена на твердом веществе (сорбенте).

По механизму взаимодействия сорбента и сорбата можно выделить несколько видов хроматографии.

Распределительная хроматография основана на различии в растворимости распределяемых веществ в неподвижной фазе (газовая хроматография) или на различии в растворимости веществ в подвижной и неподвижной жидких фазах.

Ионообменная хроматография основана на разной способности веществ к ионному обмену.

Адсорбционная хроматография основана на различии в адсорбируемости веществ твердым сорбентом.

Эксклюзионная хроматография основана на различии в размерах и формах молекул разделяемых веществ.

Этими видами не исчерпываются все механизмы разделения, например, существует осадочная хроматография, основанная на образовании отличающихся по растворимости осадков разделяемых веществ с сорбентом, адсорбционно-комплексобразовательная, основанная на образовании координационных соединений разной прочности в фазе или на поверхности сорбента и др.

Следует помнить, что классификация по механизму весьма условна: часто процесс разделения протекает сразу по нескольким механизмам. Классификацией по механизмам следует пользоваться в случае, когда известен доминирующий механизм.

По технике выполнения выделяют колоночную хроматографию, когда разделение проводится в специальных колонках, и плоскостную хроматографию, когда разделение проводится на специальной бумаге (бумажная хроматография) или в тонком слое сорбента (тонкослойная хроматография).

По цели хроматографирования выделяют аналитическую хроматографию (качественный или количественный анализ), препаративную хроматографию, используемую для получения веществ в чистом виде, для концентрирования и выделения микропримесей, промышленную (произ-

водственную) хроматографию, помогающую автоматическому управлению процессом (при этом целевой продукт из колонки поступает в датчик, управляющий процессом). Все шире хроматография используется в качестве метода научного исследования растворов, каталитических процессов, кинетики химических процессов и т.п.

Способы получения хроматограмм

Подвижную фазу, вводимую в слой неподвижной фазы, называют элюентом, а подвижную фазу, выходящую из колонки и содержащую различные компоненты, называют элюатом. В элюате тем или иным способом определяют содержание компонентов. Разделение веществ в виде отдельных полос (зон) вдоль колонки представляет собой внутреннюю хроматограмму (рисунок 2, вверху). Графическое изображение (часто получаемое с помощью самописца) распределения веществ в элюате называют *внешней хроматограммой*, или просто хроматограммой (рисунок 2а).

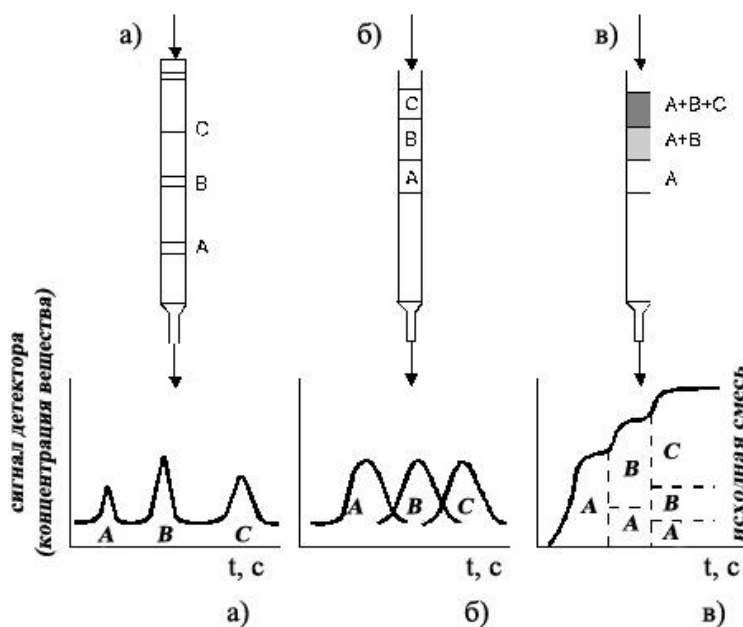


Рисунок 2. Внутренние и внешние хроматограммы, полученные методом элюентной (а), выгеснительной (б) и фронтальной (в) хроматографии (сорбируемость веществ увеличивается в ряду $A < B < C$)

По способу получения хроматограмм различают элюентную, фронтальную и вытеснительную хроматографию.

Элюентная (проявительная) хроматография. Хроматографическую колонку промывают элюентом (раствором или растворителем), обладающим меньшей сорбируемостью, чем любое из разделяемых веществ. Затем в колонку вводят разделяемые вещества, растворенные в элюенте, и продолжают непрерывно пропускать элюент (этот процесс называют элюированием). При этом разделяемые вещества перемещаются вдоль колонки с разными скоростями в соответствии с их сорбируемостью. Если скорости перемещения компонентов достаточно различаются, то на выходе из колонки сначала появляется наименее сорбируемый компонент, затем чистый элюент, затем следующий компонент и т.д. В этом случае хроматограмма представляет собой ряд пиков, имеющих форму гауссовой кривой (рисунок 2а).

Самым простым вариантом этого метода является простое элюирование (изократический режим), при котором состав элюента не меняется в процессе элюирования. Такой прием пригоден для разделения соединений с близким сродством к неподвижной фазе. В некоторых случаях используют ступенчатое или градиентное элюирование, при котором состав элюента изменяется ступенчато (дискретно) или непрерывно. В этом случае элюирующая сила подвижной фазы возрастает, в результате чего сокращается время удерживания сильно сорбируемых веществ и улучшается разделение смеси.

В дальнейшем мы будем рассматривать только элюентную хроматографию, как наиболее распространенную в современных методах хроматографического анализа. Остановимся лишь очень кратко на других способах получения хроматограмм.

Вытеснительная хроматография. Сначала в колонку вводят небольшое количество раствора разделяемых веществ. Затем через колонку

непрерывно пропускают раствор вещества (вытеснитель), обладающего большей сорбируемостью, чем любое из разделяемых веществ (рисунок 2б). По мере продвижения по колонке вытеснитель вытесняет вещество С, которое в свою очередь вытесняет вещество В и т.д. В результате анализируемая смесь перемещается впереди фронта вытеснителя, и скорость движения веществ равна скорости движения вытеснителя. Разделяемые вещества и на колонке, и в элюате располагаются последовательно друг за другом. Каждый из компонентов выделяется в чистом виде, но не количественно, так как зоны компонентов не разделены промежутками чистого сорбента.

Фронтальная хроматография. В колонку непрерывно вводят раствор разделяемых веществ, которые распределяются в колонке в соответствии с сорбируемостью. Из колонки сначала будет вытекать чистый растворитель, затем, когда сорбент насытится наименее сорбируемым веществом (А), оно появится в элюате. Когда сорбент насытится вторым наименее сорбируемым веществом (В), элюат будет содержать оба эти вещества и т.д. (рисунок 2б). Когда же сорбент будет полностью насыщен всеми компонентами смеси, состав элюата совпадает с составом раствора, вводимого в колонку. При фронтальном способе получения хроматограммы в чистом виде можно выделить лишь одно вещество. Однако внешняя хроматограмма дает представление о числе компонентов в анализируемом растворе (рисунок 2в).

Хроматографические параметры

На рисунке 3 представлена идеализированная хроматограмма смеси двух веществ.

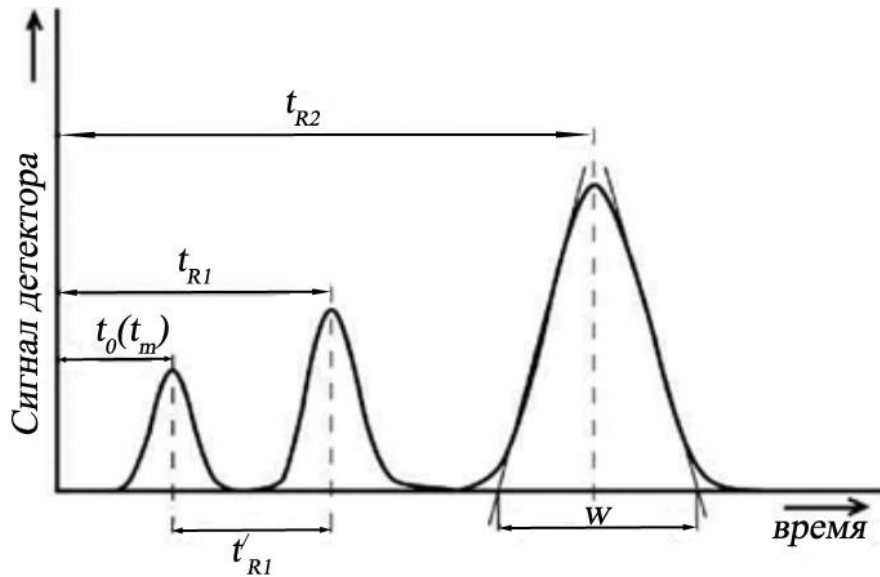


Рисунок 3. Хроматограмма двух веществ

По оси абсцисс отложено время хроматографирования (можно отложить объем элюата), по оси ординат - аналитический сигнал, связанный с концентрацией веществ в элюате (отклик) (А). Рассмотрим основные хроматографические параметры, характеризующие поведение вещества в колонке. Время от момента ввода анализируемой пробы до момента регистрации максимума пика называют временем удерживания, или временем элюирования (t_R). Время удерживания складывается из двух составляющих - времени пребывания веществ в подвижной фазе (t_m) и времени пребывания в неподвижной фазе (t_s):

$$t_R = t_m + t_s \quad (1)$$

Значение (t_m) фактически равно времени прохождения через колонку несорбируемого компонента (t_0). Значение (t_R) не зависит от количества пробы, но зависит от природы вещества и сорбента, а также упаковки сорбента и может меняться от колонки к колонке. Поэтому для характеристики истинной удерживающей способности следует вести приведенное время удерживания (t'_R):

$$t'_R = t_R + t_0 \quad (2)$$

Часто для характеристики удерживания используют удерживаемый объём V_R – объём подвижной фазы, который нужно пропустить через колонку с определённой скоростью, чтобы элюировать вещество:

$$V_R = Ft_R \quad (3)$$

где F – объёмная скорость потока (в $\text{см}^3 \text{с}^{-1}$).

Объём для вымывания несорбируемого компонента выражается через $V_0 = Ft_0$. Приведённый удерживаемый объём соответственно равен:

$$V'_R = V_R - V_0 \quad (4)$$

При постоянных условиях хроматографирования (скорость потока, давление, температура, состав фаз) значения V_R и t_R строго воспроизводимы и могут быть использованы для **идентификации** веществ.

Массу вещества, вымываемого из колонки (m) можно найти по площади под кривой элюирования:

$$m = \int_0^\infty c dV \quad (5)$$

где c – концентрация (моль/ см^3), V – объём (см^3) подвижной фазы.

Полезным параметром в хроматографии является коэффициент удерживания (замедления) R – отношение скорости движения вещества к скорости движения растворителя:

$$R = \frac{Zt_0}{Zt_R} = \frac{t_0}{t_R} \quad (6)$$

где Z – длина колонки. Таким образом, R показывает, какую долю времени вещество находится в подвижной фазе.

Учитывая (1), получим:

$$R = \frac{t_0}{(t_0 + t_S)} = \frac{1}{\left(1 + \frac{t_S}{t_0}\right)} \quad (6a)$$

Для неударживаемого вещества $t_R=t_0$ и $R=1$. Если время пребывания в подвижной и неподвижной фазах одинаково ($t_0=t_S$), то $R=0,5$. Очевидно, что R можно выразить через V_R :

$$R = \frac{V_0}{V_R} \quad (7)$$

Любой процесс распределения вещества между двумя фазами характеризуется коэффициентом распределения D . В данном случае $D=C_S/C_m$, где C_m и C_S – равновесная концентрация вещества в подвижной и неподвижной фазах соответственно. Коэффициент распределения связан с хроматографическими параметрами. Действительно, отношение времени пребывания вещества в неподвижной фазе равно отношению количества вещества в фазах (CV):

$$\frac{t_s}{t_m} = \frac{c_s V_s}{c_m V_m} = D \frac{V_s}{V_m} \quad (8)$$

Учитывая соотношение (6а), получаем:

$$R = \frac{1}{1 + D \frac{V_s}{V_m}} = \frac{V_m}{V_m + D V_s} \quad (9)$$

С другой стороны из (7) $R=V_0/V_R$, следовательно

$$V_R = V_m + D V_s \quad (10)$$

Произведение $D \frac{V_s}{V_m}$ называют коэффициентом ёмкости и обозначают k' , из экспериментальных данных его вычисляют по формуле

$$k' = \frac{V_R - V_m}{V_m} = \frac{V'_R}{V_m} \quad \text{или} \quad k' = \frac{t'_R}{t_m} \quad (11)$$

Эта величина показывает, во сколько раз вещество дольше находится в неподвижной фазе, чем в подвижной; оптимальные значения k' лежат в

пределах 1,5—4. Если коэффициент распределения мал, то мало значение k' , т. е. вещество слабо удерживается и продвигается по колонке практически с той же скоростью, что и подвижная фаза. Если же коэффициент емкости слишком велик, то время пребывания вещества в колонке будет большим и на анализ потребуется много времени.

Таким образом, приведённый удерживаемый объём связан с D простым соотношением:

$$V'_R = V_R - V_m = DV_S \quad (12)$$

Уравнения 10 и 12 являются **основными уравнениями хроматографии** и показывают, что V'_R пропорционален величине D и объёму неподвижной фазы колонки V_S . Величина V_S зависит от толщины слоя неподвижной фазы, нанесённой на сорбент, от длины и диаметра колонки. Сравнительно большие различия в значениях V'_R для двух веществ (А и В) говорят о полном их разделении.

Пример 1. Если для вещества А $D_A=15,0$, а для вещества В $D_B=75,0$ и $V_S=1,5\text{см}^3$, $V_m=3,0\text{см}^3$, то можно рассчитать $V'_R(A)$ и $V'_R(B)$, подставляя соответствующие значения в уравнение 9.

$$V'_R(A)=15*1,5+3,0=25,5 \text{ см}^3$$

$$V'_R(B)=75,0*1,5+3,0=55,5 \text{ см}^3$$

Полученные значения говорят о том, что вещество А элюируется первым, а вещество В – вторым, и, вероятно, будет происходить их полное разделение вследствие значительного различия в объёмах удерживания.

Теория хроматографического разделения.

При хроматографировании одновременно происходит два процесса: разделение веществ и размывание хроматографических пиков разделяемых веществ, что приводит к ухудшению разделения.

Хроматографическое разделение определяется различной сорбцией компонентов смеси, что связано с природой сорбента и природой разделяемых веществ. На основании сведений по термодинамике сорбции (ад-

сорбции и растворения) или ионного обмена можно судить о возможности разделения смеси веществ. Теоретический подход, объясняющий разделение, основан на изучении форм изотерм сорбции. Изотерма сорбции это графическая зависимость количества вещества в неподвижной фазе (C_s) от его концентрации в подвижной фазе (C_m) при постоянной температуре. Изотерма может быть линейной (а), выпуклой (б) или вогнутой (в) (рисунок 4). Наклон изотермы определяется коэффициентом распределения $D=dc_s/dc_m$.

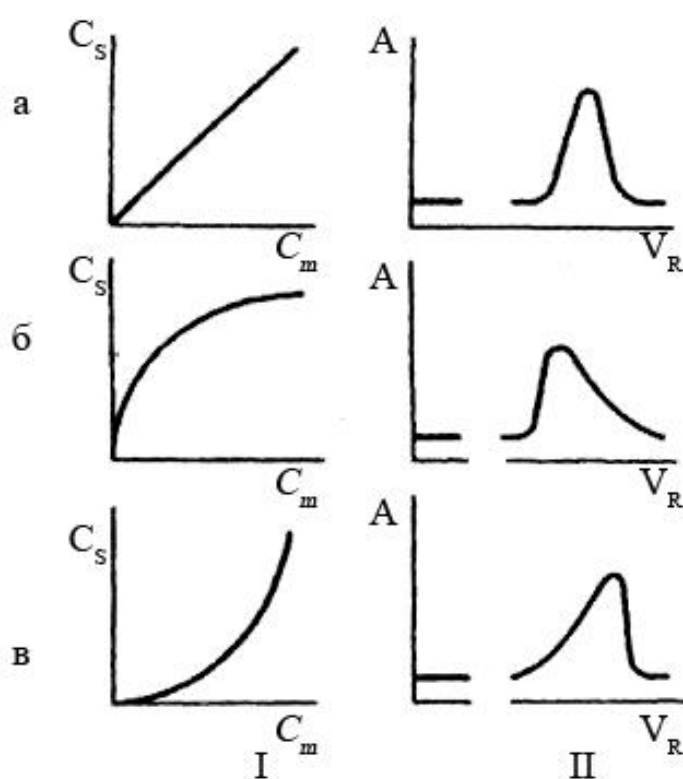


Рисунок 4. Зависимость формы хроматографических пиков от вида изотермы сорбции.

Если изотерма линейна ($D=\text{const}$), хроматограмма симметрична. Концентрация вещества максимальна в центре зоны и симметрично убывает к краям. Каждый компонент пробы перемещается с постоянной скоростью, поскольку линейная скорость миграции (U) зависит от скорости потока F (которую устанавливают постоянной) и D :

$$U = \frac{F}{V_R} = \frac{F}{V_m + DV_s} \quad (13)$$

С такой же скоростью перемещается вся зона, оставаясь симметричной. Следовательно, симметричен пик на хроматограмме. Такие пики характерны для линейной хроматографии. Это идеальный случай. Однако на практике симметричные пики получаются, когда количества вводимых в колонку веществ малы.

Выпуклый характер изотермы говорит о том, что значение D для больших концентраций вещества меньше, чем для малых, следовательно часть зоны, где концентрация больше, перемещается быстрее, чем часть зоны с малой концентрацией. В результате задняя граница хроматограммы (тыл) размывается, пик получается несимметричным (рисунок 4б). При вогнутой изотерме, напротив, размытым оказывается фронт зоны, пик также не симметричен (рисунок 4в).

В дальнейшем мы будем рассматривать только теорию линейной хроматографии (характеризующуюся линейной изотермой сорбции), поскольку в большинстве случаев стремятся работать в области линейной изотермы (с малыми пробами вещества). Однако в процессе хроматографического разделения часто происходит размывание пиков. Для объяснения, специфического для хроматографии процесса размывания, обычно используют две основные теории хроматографии: теорию теоретических тарелок и кинетическую теорию.

Теория теоретических тарелок

Теория теоретических тарелок, общая для всех многостадийных процессов (например, противоточная экстракция), впервые была предложена для описания процесса дистилляции, Мартин и Синдж распространили ее на хроматографические системы. Теория основана на некоторых допущениях:

- 1) колонка состоит из определенного числа теоретических тарелок;
- 2) равновесие на каждой тарелке считается достигнутым до того, как подвижная фаза переместится на следующую тарелку, т. е. равновесие устанавливается мгновенно;
- 3) на любой тарелке в любой момент времени число молекул (ионов) сорбируемых компонентов пробы значительно меньше, чем число сорбируемых молекул (ионов) элюента, т. е. вводимая проба должна быть малой, а изотерма — линейной;
- 4) все протекающие в колонке процессы рассматриваются как взаимно независимые.

Теоретическая тарелка — это гипотетическая зона, высота которой соответствует достижению равновесия между двумя фазами. Чем больше теоретических тарелок в колонке, т. е. чем большее число раз устанавливается равновесие, тем эффективнее колонка. Эффективность колонки — это характеристика качества колонки, определяемая числом теоретических тарелок и высотой теоретической тарелки. Так как хроматографический процесс непрерывен и неравновесен, то представление о теоретической тарелке в хроматографии имеет умозрительный, формальный характер. Эта теория позволяет описать движение зоны с максимальной концентрацией компонента, экспериментально оценить ширину полосы (степень размывания хроматографической полосы) и эффективность колонки. Она дает математическую модель продвижения полосы компонента через колонку, из которой следует, что элюированная полоса имеет форму и ширину нормального распределения Гаусса:

$$\frac{c}{c_{\max}} = e^{\frac{-(\beta-n)^2}{2n}} \quad (14)$$

где c_{\max} — концентрация в максимуме кривой; β — относительный объем

прошедшей через колонку подвижной фазы, соответствующий появлению концентрации c ; N — число теоретических тарелок.

Гауссов характер хроматограммы связан с беспорядочным движением огромного числа частиц растворенного вещества в хроматографической колонке. Время пребывания в каждой фазе может быть более или менее кратким. Одни частицы перемещаются быстрее вниз по колонке, другие — медленнее. Следствием этих случайных процессов является симметричный разброс значений скорости перемещения вокруг среднего значения, характеризующего поведение усредненной молекулы. Ширина полосы пропорциональна времени пребывания подвижной фазы в колонке и обратно пропорциональна скорости ее передвижения.

Поскольку ширина гауссовой кривой определяется стандартным отклонением σ , ширина пика w у основания треугольника равна 4σ (в интервале $\pm 2\sigma$ от максимума площадь треугольника составляет $\sim 96\%$ от площади, лежащей под кривой). Следовательно, полученная по хроматограмме величина σ служит количественной мерой размывания зоны. Величину σ можно оценить, проведя касательные к тылу и фронту хроматограммы до пересечения с нулевой (базовой) линией (см. рисунок 3).

Ширину пика можно измерять на любой высоте, так как соотношение между шириной и высотой пика для гауссовой кривой известно. Так, ширина пика на половине высоты равна $w_{1/2} = 2,35\sigma$. Ясно, что чем меньше размывание σ и чем уже хроматографический пик, тем больше пиков разделяемых веществ может быть размещено на хроматограмме за одно и то же время.

Количественной мерой эффективности хроматографической колонки служат высота H , эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ), и число теоретических тарелок N .

Число теоретических тарелок легко рассчитать непосредственно из хроматограммы, сравнивая ширину пика w и время пребывания t_R компонента в колонке:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 = \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2 \quad (15)$$

или

$$N = 5.55 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (16)$$

Определив N и зная длину колонки, легко вычислить H :

$$H = \frac{L}{N}$$

где L — длина колонки, см.

Пример 2

Для колонки длиной 20 см при $t_R = 1,5$ мин и $w = 12,1$ с число теоретических тарелок и значение H можно определить по уравнениям (15) и (16):

$$n = 16 \left(\frac{90.0 \text{ с}}{12.1} \right)^2 \approx 885; \quad H = \frac{20}{885} = 2.2 \cdot 10^{-2} \text{ см}$$

В случае высокоэффективной колонки размывание полос небольшое, пики узкие, величина H составляет 0,3—1 мм. В идеальном случае H приближается к диаметру d_p зерна сорбента. Чтобы сравнить эффективность двух колонок, следует использовать *приведенную высоту тарелки*:

$$h = \frac{H}{d_p} \quad (17)$$

При уменьшении величины H максимумы на кривой элюирования становятся более острыми.

Теория теоретических тарелок дает возможность сравнить эффективность различных колонок, оценить качество сорбента и заполнения колонки. Однако эта теория не позволяет выявить зависимость N и $N_{от}$ скорости подвижной фазы, природы и зернения сорбента, не может дать практических рекомендаций, позволяющих избежать размывания хроматографических пиков.

Кинетическая теория хроматографии

Кинетическая теория хроматографии предложена датскими химиками Ван-Деемтером и Клинкенбергом. Согласно этой теории, размывание хроматографических пиков обусловлено, главным образом, тремя независимыми процессами, вклад каждого из которых может быть оценен с помощью уравнения Ван-Деемтера:

$$H = A + \frac{B}{V} + CV \quad (18)$$

где A , B/V , CV — члены, учитывающие неравномерность движения потока подвижной фазы (вихревая диффузия), молекулярную диффузию и отклонение от сорбционного равновесия (сопротивление массопереносу) соответственно; V —линейная скорость потока.

Рассмотрим вклад каждого процесса в величину H .

Вихревая диффузия A зависит от структуры сорбента и изменяется по длине колонки. Полости между частицами наполнителя, через которые протекает подвижная фаза, имеют форму капилляров, в которых у стенок и в центре скорость потока различна. Размеры частиц неодинаковы, поэтому различна длина капилляров и соответственно скорость перемещения подвижной фазы по этим капиллярам. Вихревая диффузия — следствие изменения линейной скорости потока подвижной фазы по сравнению с ее

средним значением. Размывание зоны за счет неравномерного потока подвижной фазы описывают уравнением

$$A = 2\lambda d_p \quad (19)$$

где λ — коэффициент гомогенности упаковки колонки; d_p — диаметр частиц сорбента. Обычно величина λ изменяется от 0,1 до 0,8. Плохая упаковка и каналобразование приводят к увеличению λ , а следовательно, к уширению полосы за счет вихревой диффузии. Для уменьшения размывания полосы нужно равномерно заполнять колонку мелкими и по возможности однородными по дисперсности частицами. Фактически A определяет предельную эффективность колонки при $H = d_p$ (на практике обычно H составляет от 3 до $5d_p$).

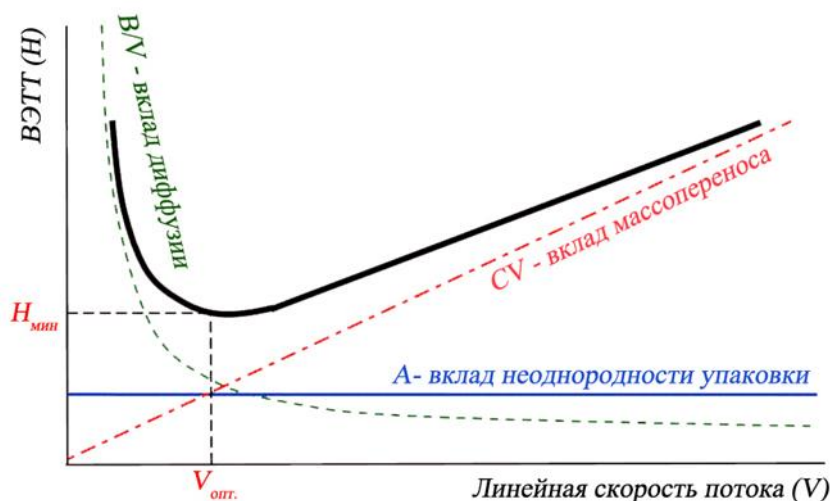


Рисунок 5. Зависимость высоты, эквивалентной теоретической тарелке, от линейной скорости потока.

Из рисунка 5 видно, что вклад вихревой диффузии в H не зависит от скорости потока V .

Молекулярная (продольная) диффузия B/V . Размывание полосы за счет молекулярной диффузии обусловлено миграцией молекул главным образом в подвижной фазе из участков полосы с большей концентрацией в направлении, где концентрация меньше, и описывается уравнением

$$B = 2\gamma D_m \quad (20)$$

где γ — коэффициент, учитывающий ограничение диффузии наполнителем колонки, его величина меньше 1; D_m — коэффициент диффузии хроматографируемого вещества в подвижной фазе. Эффективность колонки возрастает (N уменьшается) при заполнении колонки мелкими и близкими по размерам частицами, при использовании подвижных фаз, в которых коэффициенты диффузии низки, при высокой линейной скорости потока. Поскольку жидкая подвижная фаза обладает большей плотностью и вязкостью, чем газообразная, коэффициент диффузии в жидкости $D_{\text{ж}}$ значительно (на 3—4 порядка) ниже, чем в газе. Это приводит к замедлению массообмена в ЖХ сравнению с ГХ, уравнение Ван-Деемтера несколько видоизменяется и графическая зависимость эффективности N от линейной скорости потока будет такой, как показано на рисунке 5, б. Это связано с тем, что член B в уравнении (18), учитывающий продольную диффузию, в ЖХ роли не играет ($D_{\text{жидкости}} \ll D_{\text{газа}}$), минимума на кривой $H = f(v)$ в ЖХ нет.

Сопротивление массопереносу CV . Член CV в уравнении Ван-Деемтера учитывает размывание пика за счет сопротивления массопереносу при непрерывном переходе вещества из подвижной фазы в неподвижную и обратно. Таким образом, величина CV характеризует скорость распределения вещества между двумя фазами, что описывается уравнением

$$CV = \frac{8}{\pi^2} \frac{k'}{(1+k')^2} \frac{d_s^2}{D_s} V \quad (21)$$

Чем толще пленка неподвижной фазы d_s и меньше коэффициент диффузии вещества в неподвижной фазе D_s , тем сильнее размывается пик за счет замедления массопереноса в неподвижной фазе. Поскольку фактор емкости колонки k' пропорционален объему неподвижной фазы, размывание с увеличением объема неподвижной фазы V_s должно уменьшаться. Ес-

ли при этом увеличивается толщина слоя неподвижной фазы, а влияние d_s^2 преобладает, то размывание увеличивается. Влияние этого фактора неоднозначно. Итак, из уравнения Ван-Деемтера

$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_m}{u} + \frac{8}{\pi^2} \frac{k'}{(1+k')^2} \frac{d_s^2}{D_s} V \quad (22)$$

следует, что эффективность хроматографической колонки имеет сложную зависимость от скорости потока подвижной фазы и выражается гиперболой, минимум которой соответствует оптимальному значению V . Задача экспериментатора — найти оптимальную скорость потока. На рисунке 5, а приведена зависимость H от скорости потока. Минимум на кривой объясняется тем, что диффузия вносит основной вклад в величину H при низких скоростях потока, а при высоких скоростях преобладает влияние массопереноса. Минимум на кривой соответствует оптимальной скорости подвижной фазы, при которой колонка работает наиболее эффективно. Напомним, что чем меньше H , тем эффективнее колонка. Область под гиперболой можно поделить на три части, соответствующие трем членам уравнения Ван-Деемтера. Из этого также следует, что для повышения эффективности колонки необходимо уменьшить размер частиц, улучшать упаковку, подбирать оптимальную линейную скорость потока (при которой H минимальна) и маловязкие неподвижные фазы (толщина их в ГЖХ должна быть небольшой).

Пример 3

Газожидкостная хроматографическая колонка длиной 2 м имеет эффективность 2450 тарелок при $F = 15$ мл/мин и эффективность 2200 тарелок при $F = 40$ мл/мин.

Чему равна оптимальная скорость потока и какой приблизительно будет эффективность колонки при этой скорости потока?

Уравнение Ван-Деемтера в этом случае можно записать в виде

$$H = A' + \frac{B'}{F} + C'F$$

Это уравнение дифференцируют, производную приравнивают к нулю и, решив относительно F

$$\frac{dH}{dF} = -B'/F^2 + C' = 0$$

$$\text{Получают } F_{\text{opt}} = \sqrt{B'/C'}$$

Для нахождения B' и C определяют H_1 и H_2 потоков F_1 и F_2

$$H_1 = 200/2450 = 0,0816 \text{ см}; H_2 = 200/2200 = 0,0909 \text{ см}$$

и составляют два уравнения с двумя неизвестными:

$$0.0816 = B'/15 + C' \cdot 15 \quad 0.0909 = B'/40 + C' \cdot 40.$$

Отсюда

$$B' = 0,83; C' = 1,7 \cdot 10^{-3} \quad F_{\text{опт}} = \sqrt{0,83/1,7 \cdot 10^{-3}} = \sqrt{488} = 22,09 \text{ мл/мин}$$

Тогда

$$H_{\text{опт}} = B'/F_{\text{опт}} + C'F_{\text{опт}} = 0,83/22,09 + 1,7 \cdot 10^{-3} = 0,075 \text{ см}$$

$$N = L/H_{\text{опт}} = 200/0,075 = 2666 \text{ тарелок.}$$

Оценка размывания хроматографической полосы

Теория хроматографии должна не только объяснить, но и количественно оценить статистически обусловленное размывание хроматографической полосы. Размывание, приводящее к перекрыванию хроматографических пиков, происходит как в колонке, так и вне ее (внеколоночное размывание). Причины размывания соединений в хроматографической колонке подробно рассмотрены при изложении теории теоретических тарелок и кинетической теории. Внеколоночное размывание происходит в устройстве ввода пробы, коммуникациях от устройства ввода пробы до колонки и от колонки до детектора, а также в самом детекторе. Теория хроматографии позволяет оценить вклад каждого из этих факторов в размывание полосы, т. е. ширину пика, $w = 4\sigma$. Стандартное отклонение пика (σ) или дис-

персия (σ^2) являются результирующими всех случайных процессов на молекулярном уровне, вызывающих размывание. Для распределения Гаусса эффективность колонки (H , N) связана с дисперсией. ВЭТТ может быть определена как дисперсия на единицу длины колонки (L , мм):

$$H = \frac{\sigma^2}{L} \quad (23)$$

причем σ выражают в тех же единицах (длины, времени или объема), что и H . Так как $N = L/H$, то

$$N = \frac{\sigma^2}{H^2} \quad (24)$$

Теория показывает, что дисперсии, в отличие от стандартных отклонений, статистически аддитивны. Поэтому при условии взаимной независимости различных факторов, приводящих к размыванию, наблюдаемая

(суммарная) величина σ^2 может быть представлена следующим образом:

$$\sigma^2 = \sigma_1^2 + \sigma_2^2 + \dots + \sigma_n^2 \quad (25)$$

где $\sigma_1^2, \sigma_2^2, \dots, \sigma_n^2$ — дисперсии, связанные с равновесным размыванием компонента при его движении вдоль колонки, неравновесным или динамическим размыванием, связанным с сопротивлением переносу масс, диффузионными процессами в подвижной и неподвижной фазах, неравномерным перемещением потока подвижной фазы между частицами неподвижной фазы (или в порах сорбента), а также внеколоночными факторами размы-

вания. Тогда результирующее стандартное отклонение полосы $\sigma = \frac{w}{4}$ вы-

числяют как $\sqrt{\sum \sigma_i^2}$

Факторы, определяющие размывание пика и записанные через слагаемые дисперсии можно выразить через величину H , комбинируя уравнения (23) и (25):

$$H = \frac{\sigma^2}{L} = \frac{\sigma_1^2}{L} + \frac{\sigma_2^2}{L} + \dots + \frac{\sigma_n^2}{L} \quad (26)$$

Это позволяет наглядно представить, например, вклад каждого из механизмов кинетического размывания в ВЭТТ (см. рисунок 5, *a*).

Относительный вклад каждого из отдельных факторов размывания пика зависит от природы хроматографической системы: сравните уравнения Ван-Деемтера для газовой и жидкостной хроматографии. На практике следует учитывать, что в лучших конструкциях хроматографов внеколоночное размывание сводится к минимуму, например за счет уменьшения мертвого объема системы, а условия хроматографирования выбирают так, чтобы H была связана, главным образом, с одним или двумя основными факторами размывания полосы, в последнем случае они должны вносить примерно равный вклад.

Пример 4.

Стандартные отклонения хроматографического пика, связанные с несколькими факторами размывания, составляют 0,005; 0,011; 0,009 и 0,045 см. Вычислите: а) стандартное отклонение ширины пика; б) эффективность (H , см) колонки длиной 10 см; в) вклад каждого фактора в размывание пика, %.

а) $\sigma^2 = 0.005^2 + 0.011^2 + 0.009^2 + 0.045^2 = 0.00225 \text{ см}^2$, тогда $\sigma = 0,047$ см, т.е. стандартное отклонение ширины пика лишь немного больше, чем стандартное отклонение (0,045), связанное с влиянием на размывание наиболее существенного фактора;

$$\text{б) } H = \sigma^2 / L = 2.25 \cdot 10^{-4} \text{ см}$$

в) $100\sigma_i^2/\sigma^2 = 1.1\%, 5.4\%, 3.6\%$, и 91%

от суммарной дисперсии, т. е. ВЭТТ практически связана с одним фактором размывания полосы.

Селективность и разрешение

Хроматографическое разделение основано на селективности сорбента и различии в термодинамических свойствах хроматографируемых веществ в системе сорбент—элюент. Для решения вопроса о возможности хроматографического разделения смеси на индивидуальные вещества нужно сопоставить их хроматографические параметры. Для этого используют *коэффициент селективности α* и *разрешение R_s* . Коэффициент селективности является мерой относительного удерживания или относительной подвижности разделяемых веществ:

$$\alpha = \frac{t'_{R_2}}{t'_{R_1}} = \frac{V'_{R_2}}{V'_{R_1}} = \frac{D_2}{D_1} = \frac{k'_2}{k'_1} \quad (27)$$

Это термодинамическая характеристика, зависящая при постоянной температуре только от природы разделяемых соединений и свойств подвижной и неподвижной фаз.

При $\alpha = 1$ разделение в данных условиях невозможно. Поскольку скорость перемещения зоны данного вещества в колонке обратно пропорциональна коэффициенту распределения, вещества с разными D будут перемещаться вдоль колонки с разными скоростями, что и приводит к их хроматографическому разделению. Для разделения нужно так подобрать подвижную и неподвижную фазы, чтобы $D_1 \neq D_2$. Величину k' можно изменять, варьируя D , V_s , а также V_m . При малых k' компоненты, как уже указывалось, слабо удерживаются колонкой и наблюдается плохое разделение. При больших k' разделение улучшается, но увеличивается время хроматографирования. Оптимальные значения $k' = 1,5 — 4$.

Разделение двух соседних пиков характеризуется разрешением R_s (разрешение пиков), которое описывается уравнением

$$R = \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{(w_2 + w_1)/2} = 2 \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{w_2 + w_1} \quad (28)$$

где w_1 и w_2 — ширина пиков, измеренная у их основания. Если для двух близких пиков

$w_1 = w_2$, то

$$R = \frac{\Delta t_R}{w_1} = \frac{\Delta t_R}{w_2} \quad (29)$$

Таким образом, разрешение пиков зависит от их ширины и от расстояния между максимумами пиков, следовательно разрешение — функция эффективности N , коэффициента селективности α и емкости k' колонки:

$$R = 1/4 \sqrt{n} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'}{1 + k'} \right) \quad (30)$$

Из этого уравнения легко рассчитать число теоретических тарелок необходимое для разделения с заданным разрешением:

$$n = 16 R_s^2 \left(\frac{k' + 1}{k'} \right)^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \quad (31)$$

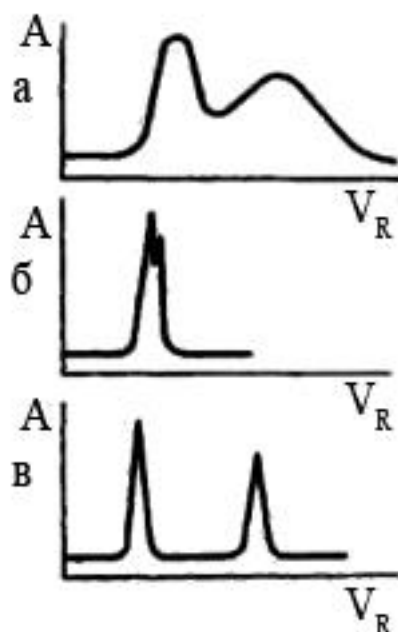


Рисунок 6. Зависимость степени разделения смеси двух веществ от эффективности колонки Из этого уравнения легко рассчитать селективности сорбента:

a — высокая селективность, но плохая эффективность; *б* — высокая эффективность, но плохая селективность; *в* — высокая эффективность, достаточная селективность

На рисунке 6 показано влияние эффективности колонки и селективности сорбента на разделение смеси двух веществ. Оптимизация разделения сводится к выбору лучшего сочетания параметров, входящих в уравнение (31). Например, для увеличения R_s в два раза нужно увеличить эффективность N или длину колонки L в четыре раза. На величину R_s в большей степени влияет коэффициент селективности: при изменении α от 1,02 до 1,04 R_s увеличивается в два раза. Для сильноудерживаемых веществ, когда $k' \gg 1$, число теоретических тарелок определяется ($R_s = 1$):

$$N = \frac{16\alpha^2}{(\alpha-1)^2} \quad (32)$$

Как видно из рисунка 7 (при постоянном параметре R_s), чем меньше коэффициент селективности α , тем большее число N необходимо для разделения двух веществ.

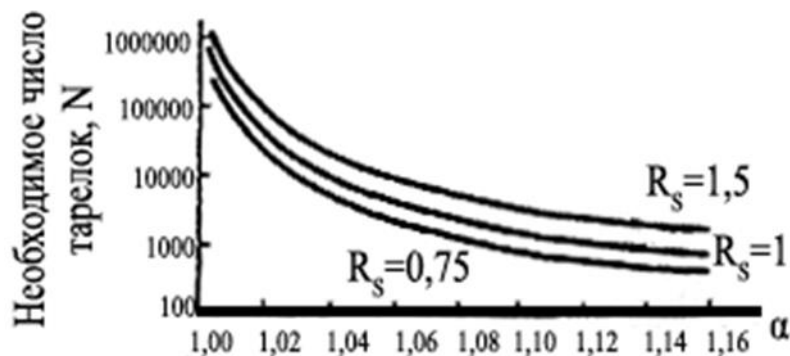


Рисунок 7. Зависимость числа теоретических тарелок, необходимого для разделения веществ A и B , от α

Для количественного разделения компонентов вполне достаточно, чтобы $R_s = 1,5$ (**6σ-разделение**). При этом пики разделены практически до нулевой (базовой) линии. Если $R_s = 1$, то расстояние между пиками 4σ

(**4σ-разделение**). Этого вполне достаточно для количественного анализа, так как перекрывается только 2% площади пиков.

Пример 5

Эффективность хроматографической колонки $N = 4200$ тарелок, время удерживания компонентов $t_{R1} = 15,05$ и $t_{R2} = 14,82$ мин. Какова степень разрешения этих соединений на колонке? Сколько теоретических тарелок потребуется, чтобы при этом времени удерживания разрешение стало равным единице?

Учтем, что для близлежащих пиков $w_1 = w_2$, $R_s = \Delta t_R / w$ и $\Delta t_R = 0,23 \text{ мин}$. Далее находят ширину пиков у основания:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2$$

$$\text{Поэтому } w = \frac{4t_R}{\sqrt{n}} = 4 \cdot 15,05 / \sqrt{4200} = 0,92 \text{ мин}; R = 0,23 / 0,92 = 0,25.$$

Если $\Delta t_R = w = 0,23$ мин, то $R_s = 1$, тогда $N = 16(15.05/0.23)^2 = 68506$ тарелок.

Хроматографическая аппаратура и обработка хроматограмм

Схема хроматографа

Хроматографическое разделение осуществляют в приборах — хроматографах, блок-схема хроматографа приведена на рисунке 8.

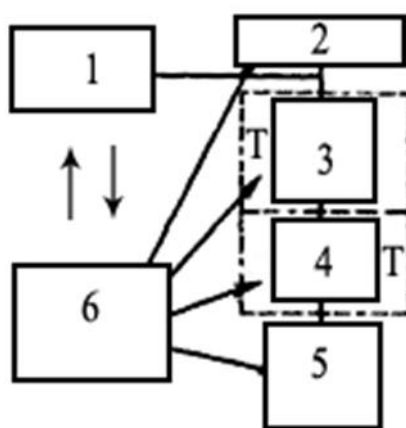


Рисунок 8. Блок-схема хроматографа:

1 — система подачи подвижной фазы (баллон с газом, насос для жидкой подвижной фазы); 2 — дозатор; 3 — колонка; 4 — детектор; 5 — регистратор, 6 — микропроцессор, ЭВМ; T — термостатируемые зоны

В современных хроматографах широко применяют микропроцессоры и ЭВМ. Основной узел хроматографа — колонка. Колонки бывают металлические, стеклянные и пластиковые. Количество вещества, выходящего из колонки, регистрируют с помощью детектора, а самописец записывает на диаграммной ленте сигналы детектора — хроматограмму.

Современный хроматограф может включать несколько колонок и различные детекторы, а также автоматическое устройство для подготовки и ввода пробы. Подсоединенный к хроматографу компьютер, имеющий запоминающее устройство и банк хроматографических данных, обеспечивает аналитика богатой информацией.

Быстрое внедрение запоминающих устройств и мощных процессоров в хроматографическую технику дает возможность значительно усовершенствовать идентификацию и количественную обработку хроматографических пиков. Для этого необходима строгая слаженность работы всей хроматографической схемы: от ввода пробы, правильного заполнения колонки, разумного выбора подвижной фазы и детектора. Кроме того, необходима автоматизация всего хроматографического процесса, которая устраняет субъективные ошибки, увеличивает скорость обработки результатов.

Общие сведения о детекторах

Детектор — прибор непрерывного действия, он должен давать отклик (аналитический сигнал) на соединения в элюате. Детекторы подразделяются на селективные (или специфические), которые чувствительны к химическим соединениям определенных классов, универсальные, которые регистрируют многие вещества, а также на деструктивные и недеструктивные по отношению к анализируемой пробе. При использовании недеструктивных детекторов можно собирать и использовать элюат.

Основные характеристики детектора:

- 1) чувствительность, характеризующаяся отношением сигнала детектора к количеству вещества;
- 2) предел детектирования (обнаружения), за минимально определяемое количество вещества принимают такое количество, которому соответствует удвоенный (иногда утроенный) сигнал шумов детектора (рисунок 9);
- 3) линейность (сигнал детектора считается линейным, если отношение сигналов детектора, соответствующих двум пробам, пропорционально отношению количеств вещества в этих пробах; любой детектор имеет линейный диапазон лишь в определенных границах количеств веществ, что показано на рисунке 10);



Рисунок 9. Шум детектора и наименьшее детектируемое количество соединения: N — уровень шума; $2N$ — наименьшее детектируемое количество соединения

4) воспроизводимость, количественной мерой которой служит стандартное отклонение серии сигналов детектора при вводе в хроматограф одних и тех же проб;

5) стабильность работы (низкая чувствительность к колебаниям температуры и скорости потока жидкости).

Способы детектирования. Работа детекторов основана на измерении таких физических и физико-химических свойств подвижной фазы и определяемых веществ, которые зависят от количества и природы вещества. Сигнал детектора A_i на вещество i описывается выражением:

$$A_i = k[a_{i0}(c) - a_0] \quad (33)$$

где k — коэффициент пропорциональности; $a_{i0}(c)$ — функция, описывающая зависимость аналитического сигнала элюата a_{i0} от концентрации данного вещества c в подвижной фазе; a_0 — аналитический сигнал подвижной фазы. Величину сигнала $A_j = kc$, практически эта зависимость может иметь вид $A_i = kc^x$, где x — число, характеризующее степень отклонения данной зависимости от линейной.

Существует три способа детектирования: прямой, непрямой (косвенное детектирование) и с послеколоночной реакцией. Прямое детектирование проводят по увеличению сигнала детектора A_j [см. уравнение (33)] (оптической плотности, электропроводности, теплопроводности, тока ионизации и др.) при прохождении через детектор зоны определяемого вещества. В этом случае сигнал подвижной фазы (элюента) a_0 должен быть

минимальным ($a_0 \ll a_{0i}(c)$). Непрямое детектирование проводят по уменьшению сигнала детектора 4 при прохождении через него зоны определяемого вещества. При непрямом детектировании используют элюент, дающий постоянный отклик детектора, $a_0 \gg a_{0i}(c)$, который ослабевает при прохождении через детектор разделенных веществ, не дающих такого отклика.

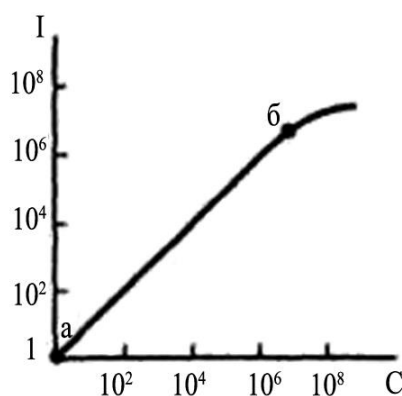


Рисунок 10. Логарифмическая зависимость детектора от концентрации вещества; отрезок [а : б] – линейная область.

Например, катионы щелочных металлов, не поглощающие в УФ-области спектра, элюируют разбавленным раствором сульфата меди (0,25 мм), в которой ион меди имеет высокое поглощение (рисунок 11).

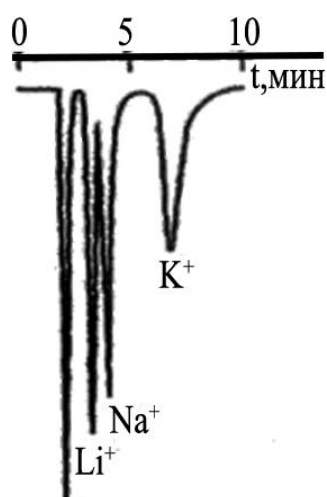


Рисунок 11. Хроматограмма катионов щелочных металлов. Непрямое детектирование ($\lambda = 220$ нм). Колонка ZipaxSCX; 4,6x120 мм. Скорость потока 0,5 мл/мин

Послеколоночную реакцию проводят для повышения чувствительности и селективности определения. Этот прием используют в жидкостной хроматографии при определении неорганических (катионы, анионы) и органических (аминокислоты и др.) соединений, а также в реакционной газовой хроматографии. Для проведения послеколоночной реакции в элюат, прошедший через колонку, вводят, например, спектрофотометрический реагент. Реагент и элюент перемешиваются в смесительной камере, которая устанавливается между колонкой и детектором. Схема камеры представлена на рисунок 12.

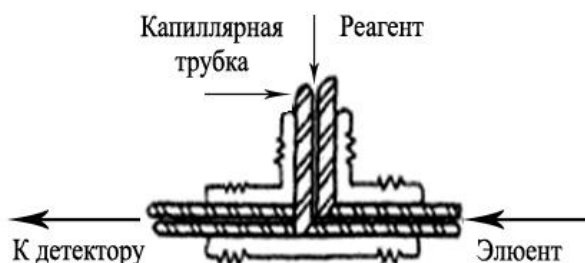


Рисунок 12. Разрез смесительной камеры для проведения послеколоночной реакции.

В результате химической модификации соединений, выходящих из колонки, образуются окрашенные или флуоресцирующие производные, чувствительность определения повышается. Рассмотренные принципы (способы) детектирования могут быть осуществлены с использованием детекторов разного типа как в жидкостной, так и в газовой хроматографии.

Общий подход к выбору детектора.

В газовой и жидкостной хроматографии выбор детектора зависит от числа определяемых соединений, их концентрации в смеси и желаемого времени анализа. Для определения большого числа соединений в одном образце используют универсальный детектор. Если нужно определять несколько соединений, близких по своим свойствам, задачу решают с помощью селективного детектора. В ряде случаев для повышения селективно-

сти и уменьшения времени анализа используют комбинации универсальных и селективных детекторов. Однако, учитывая, что хроматография является многокомпонентным методом анализа, использование универсальных детекторов в этом методе предпочтительно.

В газовой хроматографии описано несколько десятков детекторов. Полный комплект газового хроматографа включает 4—6 детекторов. Наиболее широко используют универсальные детекторы, — детектор по теплопроводности (катарометр) и пламенно-ионизационный, селективные — электронного захвата (ЭЗ), термоионный и пламенно-фотометрический. В жидкостной хроматографии чаще используют спектрофотометрические, люминесцентные и электрохимические (кондуктометрический, полярографический) детекторы.

Анализ и методы расчета хроматограмм

Хроматография позволяет не только разделять компоненты смеси, но и определять ее качественный и количественный составы, поскольку положение хроматографического пика на хроматограмме (удерживаемый объем, время удерживания) для данной хроматографической системы характеризует природу вещества, а площадь, ограниченная этой кривой и нулевой линией детектора (хроматографический пик) пропорциональна количеству данного вещества, прошедшего через детектор.

Качественный анализ.

Идентификация хроматографическими методами — это прежде всего идентификация по параметрам удерживания (t_R , V_R), которые характеризуются хорошей воспроизводимостью, относительные стандартные отклонения не превышают 0,02. Совпадение величин удерживания неизвестного и стандартного соединений свидетельствует о том, что эти соединения могут быть идентичными. Если различные вещества имеют одинаковое время удерживания, то для большей достоверности идентификации сравнение хроматографических параметров известного и неизвестного веществ про-

водят в сильно различающихся условиях. Например, получают данные об их хроматографическом поведении на колонках с различными неподвижными фазами. Если хроматографическое поведение стандартного и неизвестного веществ в таких случаях идентично, то достоверность идентификации возрастает до 99%.

При сравнении хроматограмм, полученных на разных приборах, во избежание ошибок в идентификации используют исправленное время удерживания и исправленный удерживаемый объем. Часто идентификацию проводят по относительному удерживанию $t_{\text{отн}}$, т. е. по отношению удерживаемого объема определяемого компонента к удерживаемому объему вещества, принятого за стандарт:

Эта величина зависит только от состава подвижной и неподвижной фаз.

$$t_{\text{отн}} = \frac{t_R}{t_{R,\text{ст.}}} = \frac{V_R}{V_{R,\text{ст.}}} \quad (34)$$

Для качественной идентификации удобно пользоваться индексами удерживания Ковача, которые, по существу, также являются относительными параметрами удерживания. В этом случае за стандарт берут два соседних алкана, один из которых элюируется до, а второй после исследуемого соединения, т. е. $t'_{R(z)} < t'_{R(x)} < t'_{R(z+1)}$, где z — число атомов углерода в алкане. Логарифмический индекс удерживания рассчитывают по формуле

$$I = 100 \frac{\lg t'_{R(x)} - \lg t'_{R(z)}}{\lg t'_{R(z+1)} - \lg t'_{R(z)}} + 100z \quad (35)$$

Для любого n -алкана $I = 100z$. Для всех других соединений можно определять индекс Ковача относительно шкалы измерения n -алканов, используя справочные таблицы.

Пример 6

Неизвестное соединение имеет исправленное время удерживания $t_{R(x)} = 19,5$

мин. Исправленное время удерживания н-гексана и н-гептана в этих условиях соответственно равно 13,7 и 29,3 мин. Используя эти данные, рассчитываем индекс Ковача неизвестного соединения по уравнению (35):

$$I = 100 \frac{\lg 19.5 - \lg 13.7}{\lg 29.3 - \lg 13.7} + 100 \cdot 6 = 648.2.$$

В справочных таблицах найдем, что полученное значение индекса относится к бензолу ($I=650$).

Идентификация по индексам удерживания более надежна, чем по относительным удерживаемым объемам, поэтому их используют не только для идентификации, но и для сравнительной оценки селективности неподвижных фаз.

Закономерность изменения параметров удерживания (V'_R , t'_R) в гомологическом ряду органических соединений также создает основу для идентификации. Например, в ГХ используют зависимость логарифма исправленного удерживаемого объема от числа углеродных атомов z в соединениях или от температуры кипения ($T_{кип}$) при постоянной температуре колонки:

$$\lg V'_R = A + B_z \quad (36)$$

$$\lg V'_R = A + BT_{кип} \quad (37)$$

где A и B — произвольные константы, зависящие от условий анализа и функциональной группы гомологического ряда.

Если установлено, что соединение относится к данному гомологическому ряду, для его идентификации достаточно знать характеристики удерживания нескольких членов гомологического ряда. Найденные графически или вычисленные по уравнениям (36) и (37) $T_{кип}$ или индексы удерживания $100I$ используют для идентификации гомологов.

Существует еще один способ идентификации, основанный на одновременном использовании двух детекторов. Один детектор неспецифичен

(катарометр, рефрактометр), а интенсивность сигнала другого детектора зависит от природы вещества, например детектор ЭЗ в газовой хроматографии (ГХ) или УФ-детектор в жидкостной хроматографии. Сравнение хроматограмм, полученных с помощью двух детекторов, дает информацию, например, о составе и функциональных группах органических веществ.

Пример соединения неселективного (пламенно-ионизационного) и селективного (пламенно-ионизационного со щелочным металлом) детекторов показан на рисунке 13.

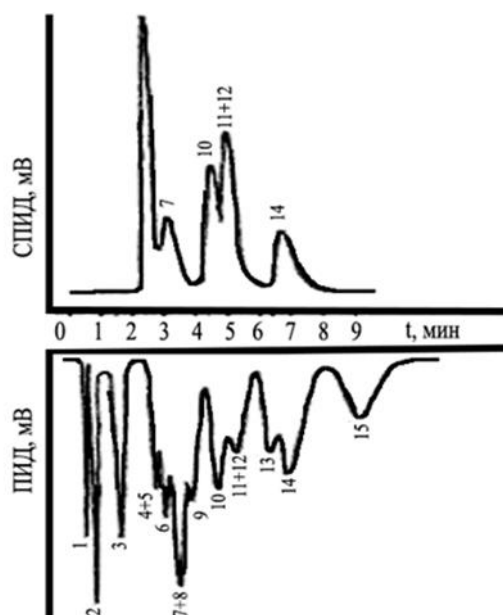


Рисунок 13. Примеры хроматограмм, полученных при объединении пламенно-ионизационного детектора (ПИД) с селективным пламенно-ионизационным детектором (СПИД):

1 — метан; 2 — пентан; 3 — циклогексан; 4 — этилацетат; 5 — тетра-хлорметан; 6 — метанол; 7 — мети-ленхлорид; 8 — этанол, 9 — бензол; 10 — трихлорэтилен; 11 — хлороформ; 12 — тетрахлорэтилен; 13 — толуол; 14 — 1,2-дихлорэтан; 15 — изоамил ацетат

Селективный детектор, поставленный вторым в серии, практически не дает отклика на углеводороды, тогда как неселективный детектор регистрирует их (вместе с галогенированными углеводородами). Это пример

простого способа качественной идентификации: компоненты смеси, на которые не дает отклика селективный детектор, относятся к классу углеводов. Однако такие существенные различия в откликах наблюдаются не всегда. Обычное соотношение откликов селективного и неселективного детекторов лежит в пределах $10\text{—}10^3$.

Иногда для идентификации используют химические реакции до или после хроматографирования. В последнем случае отобранные фракции элюата анализируют химическими или физическими методами на присутствие того или иного компонента.

Количественный анализ.

Для количественного анализа по хроматограмме сигнал детектора передается на электронное устройство, которое преобразует его в цифровую форму, либо на самописец с диаграммной лентой. В последнем случае количественный анализ проводят, измеряя высоту или площадь пика, так как эти параметры пропорциональны концентрации или количеству вещества в хроматографической зоне.

Измерение высот пиков проще и точнее, чем измерение площади особенно для веществ с малым временем удерживания и симметричным пиком. Чем меньше t_R , тем уже, острее пик.

Однако площади измеряют чаще, так как последние практически не изменяются при некоторой нестабильности экспериментальных условий. Для измерения площадей используют несколько способов (рисунок 14). Обычно проводят касательные к тылу и фронту пика и соединяют их линией, параллельной нулевой линии.

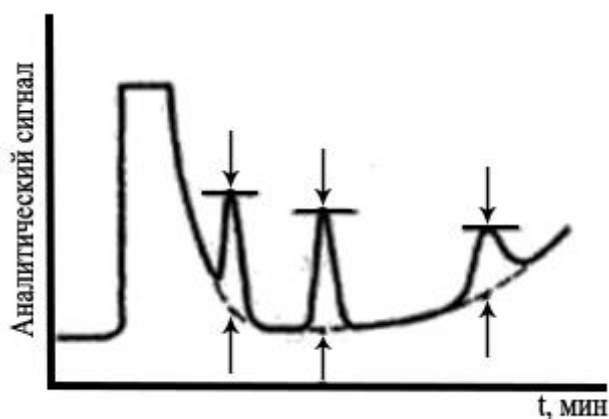


Рисунок 14 Измерение высоты пиков

Площадь полученного треугольника составляет 96% от истинной и пропорциональна количеству вещества в пробе. Для расчета площади симметричных пиков находят произведение высоты пика на его полуширину. Это произведение составляет 84% площади пика. Точность измерения площади пика зависит от отношения высоты пика к его ширине (оптимальное отношение лежит в пределах от 2 до 10).

Методы расчета хроматограмм.

Используя данные по высотам пиков или их площадям, можно рассчитать количественный состав пробы методами нормировки (с использованием или без использования поправочных коэффициентов), внешней стандартизации (абсолютной градуировки), внутренней стандартизации.

Метод нормировки чаще всего используют на практике (рисунок 15).

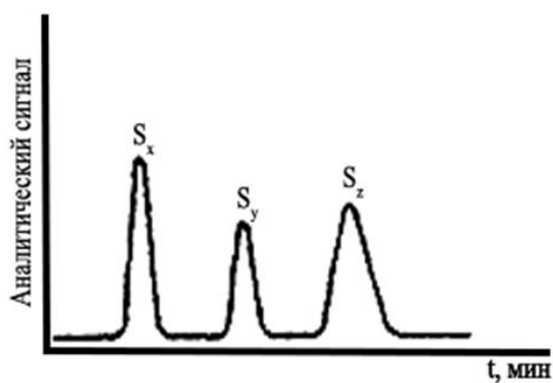


Рисунок 15. Определение концентрации веществ методом нормировки

Для его использования необходимо, чтобы на хроматограмме были зарегистрированы все компоненты, входящие в состав анализируемой смеси. Доля площади пика соответствует содержанию компонента в массовых процентах. При анализе смеси трех компонентов относительное содержание компонента, например соответствующего пику χ на хроматограмме, можно рассчитать по формуле

$$x\% = \frac{S_x}{S_x + S_y + S_z} 100, \quad (38)$$

где S_x , S_y , S_z — площади пиков. Эту формулу используют только в том случае, если детектор одинаково чувствителен к каждому из разделяемых компонентов смеси, т. е. компоненты смеси, взятые в одинаковых количествах, дают одну и ту же площадь пика.

Если же чувствительность детектора различна по отношению к каждому из компонентов пробы, то используют поправочные коэффициенты f_x , f_y ,

f_z , учитывающие чувствительность детектора к данному компоненту.

Формула для расчета в этом случае записывается так:

$$x, \% = \frac{S_x f_x}{\sum S_n f_n} 100. \quad (39)$$

Поправочные коэффициенты получают при анализе стандартных серий и рассчитывают по формуле

$$f_x = \frac{S_{cm}}{S_x} \frac{c_x}{c_{cm}} f_{cm}, \quad (40)$$

где S_x , S_{cm} — площади пиков определяемого и стандартного вещества; c_x , c_{cm} — концентрации определяемого и стандартного вещества; f_{cm} — поправочный коэффициент стандартного вещества.

Метод внешнего стандарта используют при определении отдельных веществ или анализе простых смесей, а также в случае определения микропримесей. Готовят два стандартных раствора определяемого компонента, одинаковые их количества вводят в хроматограф и определяют площадь пика (S_1 и S_2).

Результаты представляют графически (рисунок 16), либо определяют по формуле

$$X(\%) = kS_x \quad (41)$$

Градуировочный коэффициент k определяют при анализе проб стандартных серий смесей:

$$k = S_i/x_i \quad (42)$$

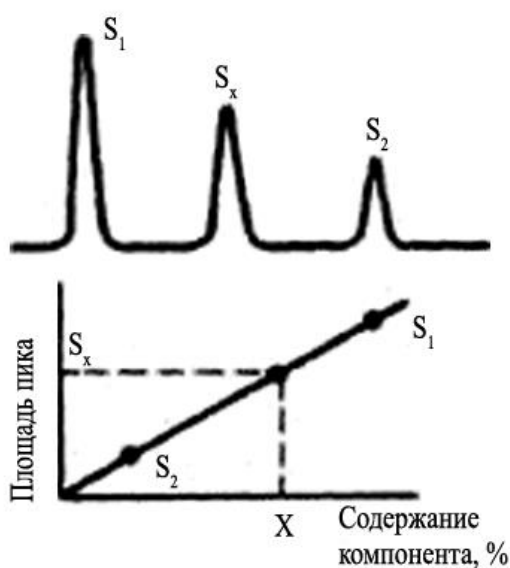


Рисунок 16. Определение компонента методом внешнего стандарта

Метод внутреннего стандарта применяют при отсутствии на хроматограмме пиков некоторых компонентов анализируемой смеси. Метод основан на том, что в анализируемую смесь вводят некоторое определенное количество стандартного вещества. Это вещество должно быть химически инертным и отсутствовать в определяемой пробе и полностью отделяться от других компонентов смеси; время его удерживания должно быть

близким к t_R определяемых компонентов; его концентрация должна быть близка к концентрациям определяемых компонентов, пик симметричным. Для определения поправочных коэффициентов (нормировочных множителей) составляют различные смеси (известного состава) внутреннего стандарта с каждым из компонентов; получают хроматограммы таких смесей. Определяют площади пиков, и для каждого компонента рассчитывают поправочный коэффициент по формуле

$$K = \frac{S_{\text{в.ст.}} \cdot C_{\text{в.ст.}}}{C_x S_x} \quad (43)$$

где $S_{\text{в.ст.}}$, S_x — площади пиков внутреннего стандарта и определяемого компонента; $C_{\text{в.ст.}}$, C_x — концентрации стандарта и исследуемого вещества в искусственных смесях. Зная поправочные коэффициенты, содержание компонента рассчитывают по формуле

$$x, \% = kr \frac{S_x}{S_{\text{в.ст.}}} 100, \quad (44)$$

Где $r = \frac{m_{\text{в.ст.}}}{m_{\text{пробы}}}$; m — масса, г

Результаты можно представить графически (рисунок 17).

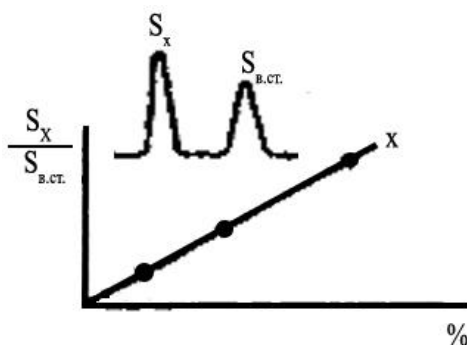


Рисунок 17. Определение компонентов методом внутреннего стандарта

Достоверность результатов и источники погрешностей

Погрешности в хроматографический количественный анализ вносят: подготовка и отбор представительной пробы, ее неомогенность (так как

работают с малыми объемами проб); аппаратура (нелинейность детектора, различная его чувствительность к компонентам пробы); обработка хроматограмм. Чаще всего хроматографы, настроенные на работу в оптимальных условиях, не вносят значительного вклада в погрешность результата. Поэтому при оценке случайных погрешностей в общую дисперсию анализа включают дисперсию, связанную с отбором пробы и с измерением площади пика. Воспроизводимость определения площадей пиков методом построения треугольника, выражаемая относительным стандартным отклонением, составляет 4%, методом произведения высоты на ширину, измеренную на половине высоты, — 2,5%, с помощью электронного цифрового интегратора — 0,4%.

Газовая хроматография

Газовая хроматография — метод разделения летучих соединений. Подвижной фазой служит инертный газ (газ-носитель), протекающий через неподвижную фазу, обладающую большой поверхностью. В качестве подвижной фазы используют водород, гелий, азот, аргон, углекислый газ. Газ-носитель не взаимодействует с разделяемыми веществами и неподвижной фазой.

В зависимости от агрегатного состояния неподвижной фазы различают два вида газовой хроматографии — газотвердофазную (неподвижная фаза — твердый носитель: силикагель, уголь, оксид алюминия) и газожидкостную (неподвижная фаза — жидкость, нанесенная на инертный носитель).

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

Газохроматографическим методом могут быть проанализированы газообразные, жидкие и твердые вещества с молекулярной массой меньше 400, удовлетворяющие определенным требованиям, главные из которых — летучесть, термостабильность, инертность и легкость получения. 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. 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.

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, что позволяет работать с большими пробами, и с легкостью получения воспроизводимых по эффективности колонок.

Неподвижные жидкие фазы.

Для обеспечения селективности колонки важно правильно выбрать неподвижную жидкую фазу. Эта фаза должна быть хорошим растворителем для компонентов смеси (если растворимость мала, компоненты выходят из колонки очень быстро), нелетучей (чтобы не испарялась при рабочей температуре колонки), химически инертной, должна обладать небольшой вязкостью (иначе замедляется процесс диффузии) и при нанесении на

носитель образовывать равномерную пленку, прочно с ним связанную. Разделительная способность неподвижной фазы для компонентов данной пробы должна быть максимальной.

Различают жидкие фазы трех типов: неполярные (насыщенные углеводороды и др.), умеренно полярные (сложные эфиры, нитрилы и др.) и полярные (полигликоли, гидроксиламины и др.).

Зная свойства неподвижной жидкой фазы и природу разделяемых веществ, например класс, строение, можно достаточно быстро подобрать подходящую для разделения данной смеси селективную жидкую фазу. При этом следует учитывать, что время удерживания компонентов будет приемлемым для анализа, если полярности стационарной фазы и веществ анализируемой пробы близки. Для растворенных веществ с близкой полярностью порядок элюирования обычно коррелирует с температурами кипения, и если разница температур достаточно велика, возможно полное разделение. Для разделения близкокипящих веществ разной полярности используют стационарную фазу, селективно удерживающую один или несколько компонентов вследствие диполь-дипольного взаимодействия. С увеличением полярности жидкой фазы время удерживания полярных соединений возрастает.

Для равномерного нанесения жидкой фазы на твердый носитель ее смешивают с легколетучим растворителем, например эфиром. К этому раствору добавляют твердый носитель. Смесь нагревают, растворитель испаряется, жидкая фаза остается на носителе. Сухим 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 °C выше той, при которой ее предполагается

использовать. При этом могут быть потери жидкой фазы, но колонка входит в стабильный рабочий режим.

Носители неподвижных жидких фаз

Твердые носители для диспергирования неподвижной жидкой фазы в виде однородной тонкой пленки должны быть механически прочными с умеренной удельной поверхностью ($20 \text{ м}^2/\text{г}$), небольшим и одинаковым размером частиц, а также быть достаточно инертными, чтобы адсорбция на поверхности раздела твердой и газообразной фаз была минимальной. Самая низкая адсорбция наблюдается на носителях из силанизированного хромосорба, стеклянных гранул и флуоропака (фторуглеродный полимер). Кроме того, твердые носители не должны реагировать на повышение температуры и должны легко смачиваться жидкой фазой. В газовой хроматографии хелатов в качестве твердого носителя чаще всего используют силанизированные белые диатомитовые носители — диатомитовый кремнезем, или кизельгур. Диатомит — это микроаморфный, содержащий воду, диоксид кремния. К таким носителям относят хромосорбW, газохромQ, хроматон N и др. Кроме того, используют стеклянные шарики и тефлон.

Химически связанные фазы. Часто используют модифицированные носители, ковалентно связанные с «жидкой» фазой. При этом стационарная жидкая фаза более прочно удерживается на поверхности даже при самых высоких температурах колонки. Например, диатомитовый носитель обрабатывают хлорсиланом с длинноцепочечным заместителем, обладающим определенной полярностью. Химически связанная неподвижная фаза более эффективна.

Особенности газовых хроматографов

Остановимся на особенностях газовых хроматографов (см. рисунок 8). Газ-носитель подается из баллона под определенным постоянным давлением, которое устанавливается при помощи специальных клапанов. Скорость потока в зависимости от размера колонки, как правило, составля-

ет 20—50 мл-мин⁻¹. Пробу перед вводом в колонку дозируют. Жидкие пробы вводят специальными инъекционными шприцами (0,5—20 мкл) в поток газа-носителя (в испаритель) через мембрану из силиконовой самоуплотняющейся резины. Для введения твердых проб используют специальные приспособления. Проба должна испаряться практически мгновенно, иначе пики на хроматограмме расширяются, и точность анализа снижается. Поэтому дозирующее устройство хроматографа снабжено нагревателем, что позволяет поддерживать температуру дозатора примерно на 50 °С выше, чем температура колонки.

Применяют разделительные колонки двух типов: насадочные (набивные) и капиллярные. Насадочные колонки диаметром 2—6 мм и длиной 0,5—20 м изготавливают из боросиликатного стекла, тефлона или металла. В колонки помещают стационарную фазу: в газотвердофазной хроматографии это адсорбент, а в газожидкостной хроматографии — носитель с тонким слоем жидкой фазы. Правильно подготовленную колонку можно использовать для нескольких сотен определений. Капиллярные колонки разделяют по способу фиксации неподвижной фазы на два типа: колонки с тонкой пленкой неподвижной жидкой фазы (0,01—1 мкм) непосредственно на внутренней поверхности капилляров и тонкослойные колонки, на внутреннюю поверхность которых нанесен пористый слой (5—10 мкм) твердого вещества, выполняющего функцию сорбента или носителя неподвижной жидкой фазы. Капиллярные колонки изготавливают из кварца; диаметр капилляров 0,2—0,5 мм, длина от 10 до 100 м.

Температура колонок определяется главным образом летучестью пробы и может изменяться в пределах от -196 °С (температура кипения жидкого азота) до 350 °С. Температуру колонки контролируют с точностью до нескольких десятых градуса и поддерживают постоянной с помощью термостата. Прибор дает возможность в процессе хроматографирова-

ния повышать температуру с постоянной скоростью (линейное программирование температуры).

Для регистрации веществ, элюируемых из колонки, в комплект газового хроматографа входит несколько различных детекторов. Сравнительная характеристика детекторов приведена в таблице 1.

Таблица 1. Сравнительные характеристики газохроматографических детекторов

Детектор	Предел обнаружения	Диапазон линейности детектора
Катарометр	10^{-12} г/мл	10^5
Пламенно-ионизационный	10^{-12} г/с	10^7
Электронного захвата	10^{-14} г/мл	10^4
Термоионный	10^{-15} г/с	10^3
ИК-спектрометр	> 1 мкг	10^3
Масс-спектрометр	10^{-12} - 10^{-14} г	10^6

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. Особенности всех видов ЖХ обусловлены наличием жидкой подвижной фазы.

Сорбция компонентов из газа и жидкого элюента осуществляется по-разному. В отличие от газа, который выполняет только транспортную функцию и не сорбируется неподвижной фазой, жидкая подвижная фаза —

активный элюент, молекулы которой могут сорбироваться на поверхности. При прохождении через колонку находящиеся в элюенте молекулы интересующего нас компонента должны вытеснить молекулы элюента с поверхностного слоя сорбента, что приводит к уменьшению энергии взаимодействия молекул вещества с поверхностью сорбента. Поэтому величины V_R , пропорциональные $-\Delta G$ (изменению свободной энергии), также меньше в ЖХ, чем в ГХ; диапазон линейности изотермы сорбции в ЖХ больше.

Применяя различные элюенты, можно изменять параметры удерживания и селективность хроматографической системы. Возможно использование градиентного элюирования. Селективность в ЖХ в отличие от ГХ определяется не одним, а двумя факторами — природой подвижной (элюент) и неподвижной фаз.

В классическом варианте ЖХ в стеклянную колонку длиной 1—2 м, заполненную сорбентом (размер частиц >100 мкм), вводят анализируемую пробу и пропускают элюент. Скорость прохождения элюента под действием силы тяжести мала, а продолжительность анализа значительна. Классический вариант до сих пор применяют в лабораторной практике, поскольку он не требует дорогостоящего оборудования. Вследствие использования сорбентов с размером зерен 10—30 мкм, поверхностно- и объемно-пористых сорбентов с размером частиц 5—10 мкм, нагнетательных насосов, чувствительных детекторов произошел переход от классической к высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Быстрый массоперенос при высокой эффективности разделения позволяет использовать ВЭЖХ для разделения и определения молекул (адсорбционная и распределительная хроматографии), для разделения и определения ионов (ионообменная, ионная, ион-парная хроматографии), для разделения макромолекул (эксклюзионная хроматография). Методами аффинной и лигандообменной хроматографии разделяют биологически активные молекулы и оптические изомеры.

Адсорбционная хроматография

В адсорбционном варианте жидкостной хроматографии в зависимости от полярности неподвижной и подвижной фаз различают нормально-фазовую (НФХ) и обращенно-фазовую (ОФХ) хроматографии. В НФХ используют полярный адсорбент и неполярные подвижные фазы, в ОФХ — неполярный адсорбент и полярные подвижные фазы. В обоих случаях выбор подвижной фазы часто важнее, чем выбор неподвижной. Неподвижная фаза должна удерживать разделяемые вещества. Подвижная фаза, т. е. растворитель, должна обеспечить различную емкость колонки и эффективное разделение за приемлемое время.

Неподвижные фазы. Адсорбенты различных типов (полярные и неполярные) проявляют неодинаковую селективность по отношению к разделяемым соединениям. В качестве адсорбентов применяют тонкодисперсные пористые материалы с удельной поверхностью более $50 \text{ м}^2\text{г}^{-1}$.

Полярные адсорбенты (SiO_2 , Al_2O_3 , оксиды металлов, флорисил и др.) имеют на поверхности слабокислотные ОН-группы, способные удерживать вещества с основными свойствами. Эти адсорбенты применяют главным образом для разделения неполярных соединений и соединений со средней полярностью.

Недостаток полярных адсорбентов — высокая чувствительность к содержанию воды в растворителях: например, силоксановые группы — $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$ на поверхности SiO_2 в присутствии воды переходят в силанольные $\equiv\text{Si}-\text{OH}$, при этом изменяются свойства поверхности и результаты становятся невоспроизводимыми. Для ВЭЖХ применяют полярные сорбенты с привитыми полярными группами (амины, диолы и др.), что позволяет менять селективность, подбирая подходящий элюент.

Кроме указанных сорбентов, используют поверхностно-пористые носители (ППН). Это могут быть жесткие непористые носители (стеклянные шарики), покрытые тонким пористым слоем активного полярного или

неполярного сорбента. Такие сорбенты оказывают малое сопротивление потоку, за счет чего увеличивается скорость анализа.

Подвижные фазы.

Как уже отмечалось, в ЖХ важен выбор подвижной фазы, поскольку она оказывает большее влияние на селективность разделения, эффективность колонки и скорость движения хроматографической полосы. Подвижная фаза должна растворять анализируемую пробу, обладать малой вязкостью (коэффициенты диффузии компонентов анализируемой пробы должны быть достаточно большими), из нее должно быть возможным выделение разделенных компонентов. Подвижная фаза должна быть инертной по отношению к материалам всех частей хроматографа, безопасной, дешевой, подходящей для данного детектора.

Как было сказано, разделения достигают, меняя элюирующую силу подвижной фазы — растворителя. *Элюирующая сила растворителя* показывает, во сколько раз энергия сорбции данного элюента больше, чем энергия сорбции элюента, выбранного в качестве стандарта, например «-гептана. Растворители (элюенты) делят на слабые и сильные. Слабые растворители слабо адсорбируются неподвижной фазой, поэтому коэффициенты распределения сорбируемых веществ (сорбата) высокие. Сильные растворители сильно адсорбируются, поэтому $D_{\text{сорбата}}$ низкие. Растворитель тем сильнее, чем выше растворимость в нем анализируемой пробы, чем сильнее взаимодействие растворитель—сорбат.

Имеются данные об относительной силе растворителей для разных адсорбентов. Для SiO_2 сила растворителей увеличивается в ряду: пентан (0) < CCl_4 (0,11) < бензол (0,25) < CHCl_3 (0,26) < CH_2Cl_2 (0,32) < ацетон (0,47) < диоксан (0,49) < ацетонитрил (0,5).

Элюирующая сила определяется полярностью растворителя. В нормально-фазовой хроматографии с увеличением полярности растворителя элюирующая сила растворителя растет, в обращенно-фазовом варианте —

снижается. В качестве меры относительной полярности принимают параметр Гильдебранда P . Расположение растворителей в соответствии с возрастанием их элюирующей силы называют *элюотропным рядом*. В жидкостной адсорбционной хроматографии элюотропный ряд Снайдера имеет вид (в скобках приведены значения элюирующей силы): пентан (0) < «-гексан (0,01), гептан (0,01) < циклогексан (0,04) < CCl_4 (0,18) < бензол (0,32) < CHCl_3 (0,38) < ацетон (0,51), этанол (0,88) < вода, CH_3OOH (очень большая).

Часто применяют не индивидуальные растворители, а их смеси. Незначительные добавки другого растворителя, особенно воды, существенно увеличивают элюирующую силу элюента. Например, к-пентан (0,00), л-пентан + 10% изопропилхлорида (0,10), н-пентан + 4% эфира (0,2) и т. д.

При разделении многокомпонентных смесей одна подвижная фаза в качестве элюента может не разделить все компоненты пробы за приемлемое время, в этом случае применяют метод ступенчатого или градиентного элюирования. Для увеличения силы элюента в процессе хроматографирования последовательно применяют все более сильные элюенты. Это позволяет элюировать все более сильноудерживаемые вещества за меньшее время.

Установлены некоторые эмпирические правила, помогающие при выборе элюента. Сорбция, как правило, увеличивается с ростом числа двойных связей и ОН-групп в соединениях. Сорбция уменьшается в ряду органических соединений: кислоты > спирты > альдегиды > кетоны > сложные эфиры > ненасыщенные углеводороды > насыщенные углеводороды. Для разделения веществ разной полярности и для разделения соединений разных классов применяют нормально-фазовую хроматографию: из неполярных подвижных фаз соединения разных классов выходят из колонки с полярным адсорбентом за разное время (время удерживания соединений с разными функциональными группами увеличивается при переходе

от неполярных соединений к слабополярным). Для очень полярных молекул t_R так велики, что при использовании неполярного элюента анализ невозможен. Для уменьшения времени удерживания полярных сорбатов переходят к полярным элюентам. В обращенно-фазовом варианте неподвижная обращенная фаза сильнее адсорбирует неполярные компоненты из полярных элюентов, например из воды. Снижая полярность элюента добавлением менее полярного растворителя (метанол), можно уменьшить удерживание компонентов.

Механизм удерживания в ЖХ чаще бывает смешанным, т. е. удерживание происходит по адсорбционному, распределительному, эксклюзивному механизмам. Выделить преобладающий тип часто сложно или невозможно. В адсорбционной хроматографии распределение сорбата между подвижной жидкой и неподвижной твердой фазами происходит за счет взаимодействий двух видов: неспецифических (дисперсионные, индукционные, ориентационные) и специфических, вносящих основной вклад в величины удерживания, под которыми понимают, например образование водородных связей с неподвижной твердой фазой. Механизм удерживания зависит от природы сорбента. На полярных адсорбентах удерживание компонентов пробы обусловлено их взаимодействием с гидроксильными группами адсорбента (силикагель, оксид алюминия и др.) с образованием Н-связей. Полярные молекулы удерживаются сильнее неполярных. На обращенно-фазовых сорбентах с привитыми фазами C_{18} механизм удерживания более сложен. Привитые молекулы C_{18} удерживают сорбат за счет неспецифических взаимодействий. Кроме того, возможно взаимодействие силанольных групп, не прореагировавших с октадецилсиланом из-за стерических препятствий, с молекулами растворителей, а также с металлами и другими компонентами по механизму ионного обмена. Также было высказано предположение, что на поверхности «щеточного» сорбента за счет адсорбции удерживается слой жидкой фазы, обогащенной менее полярным

растворителем из подвижной фазы, т. е. состав этого слоя отличается от состава подвижной фазы, и разделение происходит за счет распределения компонентов между двумя несмешивающимися жидкостями. Поэтому разделение на «щеточных» сорбентах иногда относят к распределительной хроматографии. Четко разграничить адсорбционную и распределительную хроматографии трудно.

Особенности жидкостных хроматографов

Жидкостной хроматограф — более сложный прибор по сравнению с газовым (см. рисунок 8). Это связано с тем, что система подачи элюента включает ряд дополнительных узлов: систему дегазации, устройство для создания градиента, насосы и измерители давления. Насосы должны обеспечить постоянную скорость потока от 0,1 до 10 мл/мин при давлении до 400 атм. Тщательное обезгаживание всех используемых растворителей необходимо ввиду того, что появление пузырьков газа в детекторе делает невозможным его использование.

Жидкостной хроматограф имеет достаточно сложное градиентное устройство, обеспечивающее отбор элюентов из 2—3 емкостей в смеситель, затем в колонку, а также дозаторы, работающие при высоких давлениях. Для ввода пробы используют петлевые дозаторы или специальные микрошприцы. Пробу вводят через прокладку из специальных ненабухающих полимерных материалов. Часто используют дозатор с остановкой потока.

В ВЭЖХ обычно используют прямые колонки длиной 10, 15, 25 см с внутренним диаметром 4—5,5 мм. В микроколоночных хроматографах используют колонки длиной 5—6 см и диаметром 1—2 мм. Колонки изготавливают из стекла или нержавеющей стали. В жидкостных хроматографах часто используют автоматические коллекторы фракций, что позволяет анализировать количественно собранные вещества другими химическими или физическими методами. Все объемы соединительных трубок, колонок,

ячейки детектора, ввода пробы должны быть как можно меньшими, чтобы избежать внеколоночного размывания хроматографической полосы.

Ионообменная хроматография

Терминология и принципы разделения ионов в сорбционных процессах

Ионообменная хроматография относится к жидкостно-твердофазной хроматографии, в которой подвижной фазой является жидкость (элюент), а неподвижной фазой - твердое тело (ионообменник). В основе метода ионообменной хроматографии лежит динамический процесс замещения ионов, связанных с неподвижной фазой, ионами элюента, поступающими в колонку. Разделение происходит благодаря разному сродству к ионообменнику ионов, находящихся в смеси, что приводит к различным скоростям их перемещения по колонке. Ионная хроматография представляет собой вариант колоночной ионообменной хроматографии.

Согласно рекомендациям ИЮПАК (1993 г.) термины ионообменная (ИОХ) и ионная (ИХ) хроматография определяются следующим образом. "Ионообменная хроматография основана на различии ионообменных взаимодействий для индивидуальных анализируемых веществ. Если ионы разделяются и могут быть детектированы с помощью кондуктометрического детектора или косвенного УФ - детектирования, то она называется ионной хроматографией". Современная (2005 г.) формулировка: "Ионная хроматография включает все высокоэффективные жидкостные хроматографические (ВЭЖХ) разделения ионов в колонках, объединенные с непосредственным детектированием в проточном детекторе и количественной обработкой полученных аналитических сигналов". Это определение характеризует ионную хроматографию безотносительно механизма разделения и метода детектирования и тем самым отделяет ее от классического ионного обмена.

В ионной хроматографии применяются следующие принципы разделения:

- Ионный обмен.
- Образование ионных пар.
- Эксклюзия ионов.

Ионный обмен

Ионный обмен представляет собой обратимую гетерогенную реакцию эквивалентного обмена ионов, находящихся в фазе ионита (противоионов), на ионы элюента. Противоионы удерживаются функциональными группами ионита за счет электростатических сил. Как правило, в катионной хроматографии эти группы являются группами сульфоновых кислот; в случае анионной хроматографии – четвертичных аммониевых оснований. На рисунке 18 представлена схема процесса обмена катионов и анионов. Ионы определяемого вещества обозначены как А, ионы элюента, конкурирующие с ними за обменные центры, – Е.

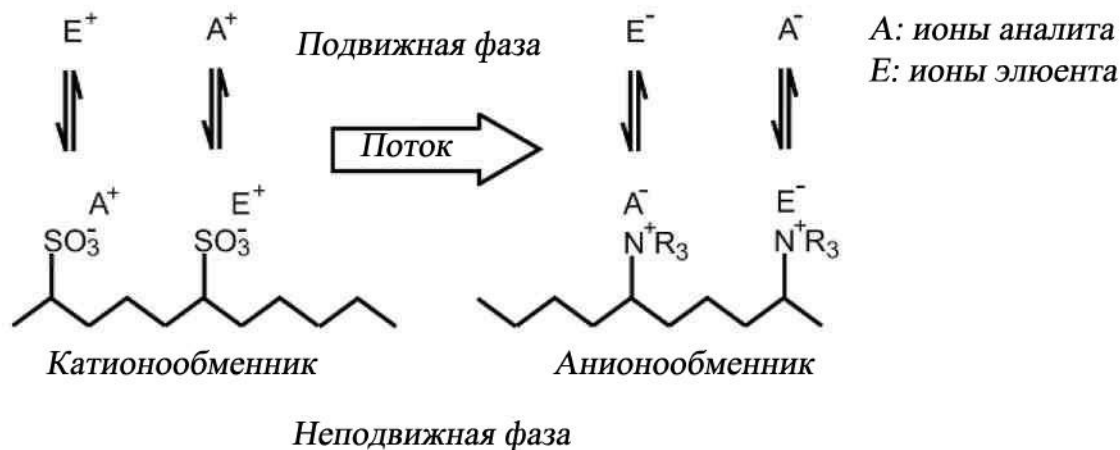


Рисунок 18. Ионный обмен катионов (A^+) и анионов (A^-) на ионы элюента (E^+ или E^-) с участием катионообменника, содержащего функциональные сульфогруппы – SO_3^- , и анионообменника (группы четвертичного аммониевого основания $-N^+R_3$).

Образование ионных пар

Для реализации этого механизма разделения применяют ион-парные реагенты, которые добавляют в раствор элюента. Такие реагенты представляют собой анионные или катионные поверхностно-активные вещества, например, алкилсульфоновые кислоты или тетраалкиламмониевые соли.

Вместе с противоположно заряженными определяемыми ионами ионы этого ион-парного реагента образуют незаряженную ионную пару, которая может удерживаться на неподвижной фазе за счет межмолекулярных взаимодействий. Разделение осуществляется за счет различия констант образования ионных пар и степени их адсорбции на матрице сорбента. На рисунке 19 показана статическая ионообменная модель в ион-парной хроматографии после адсорбции реагента на неподвижной фазе. Этот принцип разделения применяется как для анионов, так и для катионов.

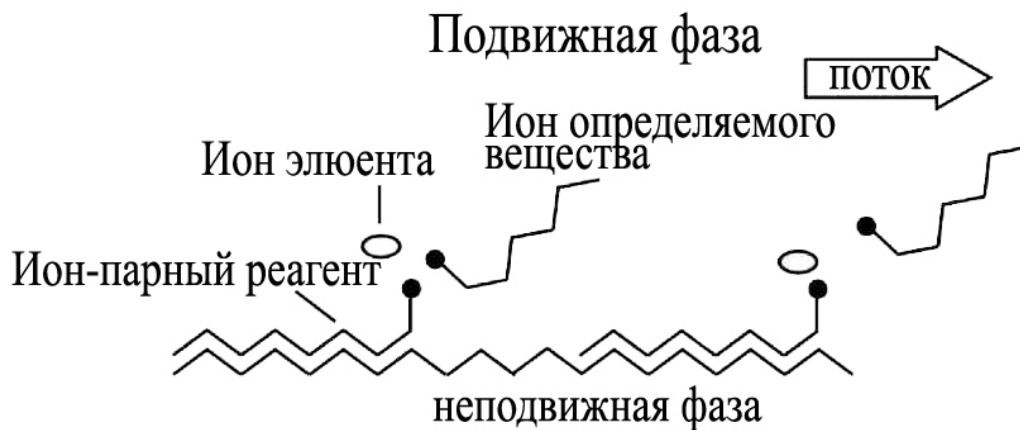


Рисунок 19. Ионообменная модель в ион-парной хроматографии.

Ионная эксклюзия

Ионоэкслюзионная хроматография (ИЭХ). в основном, применяется для разделения слабых кислот или оснований. Наибольшее значение ИЭХ имеет для определения карбоновых и аминокислот, фенолов, углеводов.

На рисунке 20 показан принцип разделения с помощью ИЭХ на примере кислот $R-COOH$.

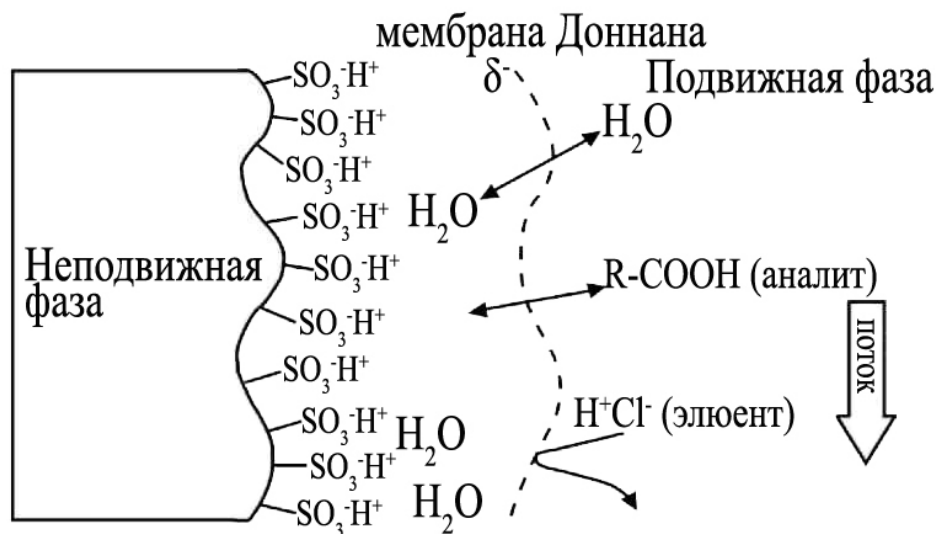


Рисунок 20. Схема разделения карбоновых кислот $R-COOH$ с использованием ионоэкслюзионной хроматографии.

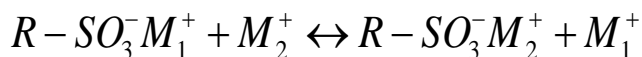
В ионоэкслюзионной хроматографии в качестве неподвижной фазы часто применяют полностью сульфированный катионообменник, содержащий ионы водорода (противоионы). В водном растворе элюента сульфокислотные группы ионита гидратируются. Гидратная оболочка ограничивается воображаемой отрицательно заряженной мембраной (Доннановской мембраной). Мембрана проницаема только для недиссоциированных молекул (например, воды).

Органические карбоновые кислоты могут быть разделены, если в качестве элюента применяются сильные минеральные кислоты. Вследствие низких значений констант кислотности карбоновые кислоты присутствуют в таких растворах в недиссоциированной форме. Эти формы могут проходить через мембрану Доннана и адсорбироваться на неподвижной фазе.

Ионообменные равновесия

Ионообменный процесс представляет собой гетерогенную обратимую химическую реакцию. Реакцию обмена двух однозарядных катионов

M_1^+ и M_2^+ с участием сульфокислотного катионита ($R-SO_3^-M^+$, где R - матрица ионообменника; SO_3^- - функциональная ионогенная группа; M^+ - противоион) можно записать следующим образом:



Константа равновесия этой реакции (константа ионного обмена) имеет вид:

$$K_{M_2}^{M_1} = \frac{\overline{[M_2^+]}\overline{[M_1^+]}}{[M_1^+][M_2^+]} \quad (45)$$

Или

$$\frac{\overline{[M_2^+]}}{[M_1^+]} = K_{M_2}^{M_1} \frac{[M_1^+]}{\overline{[M_2^+]}} \quad (46)$$

Здесь $\overline{[M_1^+]}$ и $\overline{[M_2^+]}$ - равновесные концентрации ионов M_1^+ и M_2^+ в фазе ионита; $[M_1^+]$ и $[M_2^+]$ - равновесные концентрации ионов в растворе.

Константа ионного обмена характеризует способность ионообменника к обмену с теми или иными ионами из раствора. Если $K_{M_2}^{M_1} > 1$, то ион M_2^+ , находящийся в растворе, имеет большее сродство к иониту, чем ион M_1^+ . Направление процесса ионного обмена меняется ($K_{M_2}^{M_1} < 1$), если M_1^+ сорбируется лучше по сравнению с ионом M_2^+ . При $K_{M_2}^{M_1} = 1$ сродство ионов

M_1^+ и M_2^+ к катиониту одинаковое.

Если обмениваются ионы, имеющие разные заряды (Z), константа ионного обмена равна:

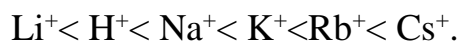
$$K_{M_2}^{M_1} = \frac{\overline{[M_2^+]}}{[M_2^+]} \frac{1}{\overline{[M_1^+]}} \frac{[M_1^+]^{\frac{1}{Z_{M_1}}}}{[M_1^+]^{\frac{1}{Z_{M_1}}} [M_2^+]^{\frac{1}{Z_{M_2}}}} \quad (47)$$

При обмене ионов равного заряда отношение между концентрациями этих ионов практически не меняется с разбавлением раствора. В более

разбавленных растворах ионы с большой величиной заряда сильнее удерживаются ионитом.

Этот эффект успешно используют для умягчения воды. Разбавленные растворы кальциевых и магниевых солей (жесткая вода) пропускают через колонку с катионитом в Na^+ - форме. Низкая концентрация ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} благоприятствует их сорбции катионитом. В процессе регенерации ионита пропускают достаточно концентрированный раствор NaCl , при этом ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} вытесняются из фазы катионита. Такие процессы применяют в химическом анализе, чтобы разделить ионы разного заряда, и для избирательного концентрирования следовых количеств ионов из разбавленных растворов.

Порядок селективности на сульфокатионитах ($\text{R-SO}_3\text{-H}^+$) следующий: Наиболее сильно гидратированный ион Li^+ слабо удерживается ионитом, а для наименее гидратированного иона Cs^+ характерна значительная сорбция:



Для карбоксильных катионитов ($\text{R-COO}^-\text{H}^+$) порядок сродства обратный, причем существенное влияние на избирательность сорбции оказывает степень нейтрализации $-\text{COOH}$ -групп (т.е. величина рН анализируемого раствора). Для сорбции на сильнокислотных катионитах двухзарядных катионов щелочноземельных элементов (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+}) наблюдается такая же закономерность, что и для однозарядных катионов. Сложнее сравнивать сродство ионов, имеющих различные заряды, т.к. при разбавлении раствора ионообменное равновесие смещается.

Для анионов такой вывод применять на практике сложнее. Известен следующий сорбционный ряд при использовании сильноосновных анионообменников ($\text{R-N}^+(\text{CH}_3)_3\text{OH}^-$): $\text{F}^- < \text{OH}^- < \text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{I}^- < \text{SCN}^- < \text{ClO}_4^-$. Повышенной сорбцией характеризуются анионы сильных кислот с большим ионным радиусом и имеющие наименьший заряд. Чем больше размеры иона, тем в

большей степени разрушается структура воды. Ионы с высоким зарядом и основным характером препятствуют такому процессу, поскольку они образуют водородные связи с молекулами воды или вступают в реакции гидролиза.

Таким образом, на ионообменное равновесие влияют многие факторы и количественная теория рассматривает доминирующие процессы с учетом конкурирующих реакций кислотно-основного взаимодействия и комплексообразования, термодинамических характеристик гидратации ионов, а также особенностей состава и структуры ионита.

Неподвижные фазы (сорбенты) в ионной хроматографии

Требования к сорбентам

Выбор неподвижной фазы имеет большое значение при проведении любого хроматографического разделения. Синтез сорбентов для ионной хроматографии затруднен, поскольку к ним предъявляется довольно много требований:

- сорбент должен иметь низкую ионообменную емкость (0,001-0,1 мэкв/г). Чтобы обеспечить низкий фоновый сигнал в ионной хроматографии используют элюенты (растворы кислот, солей, оснований) с концентрацией менее 0,01 М. Для эффективного разделения с помощью таких элюентов требуются низкоемкостные ионообменные сорбенты;

- диаметр зерен сорбента не должен превышать 20 мкм (обычно он равен 5–10 мкм). Только в этом случае можно достичь высокой эффективности разделения.

- зерна сорбента должны обладать высокой механической прочностью и устойчивостью к давлению, которое возникает при работе с мелкодисперсной неподвижной фазой;

- сорбент должен обладать высокой химической устойчивостью по отношению к элюирующему раствору. Он должен сохранять стабильность в широком интервале pH.

Для использования в ионной хроматографии пригоден широкий круг различных органических и неорганических сорбентов. На их поверхности имеются функциональные группы, которые способны к обмену ионов. В ионной хроматографии в качестве сорбентов могут применяться следующие вещества:

- Модифицированные органические полимерные смолы.
- Модифицированные силикагели.
- Неорганические соли (например, полифосфаты).
- Стекла.
- Цеолиты.
- Оксиды металлов (например, Al_2O_3).
- Производные целлюлозы.

На практике чаще используют модифицированные органические полимерные смолы и силикагели. Схематично обзор неподвижных фаз, которые применяются в ионной хроматографии, приведен на рисунке 21.

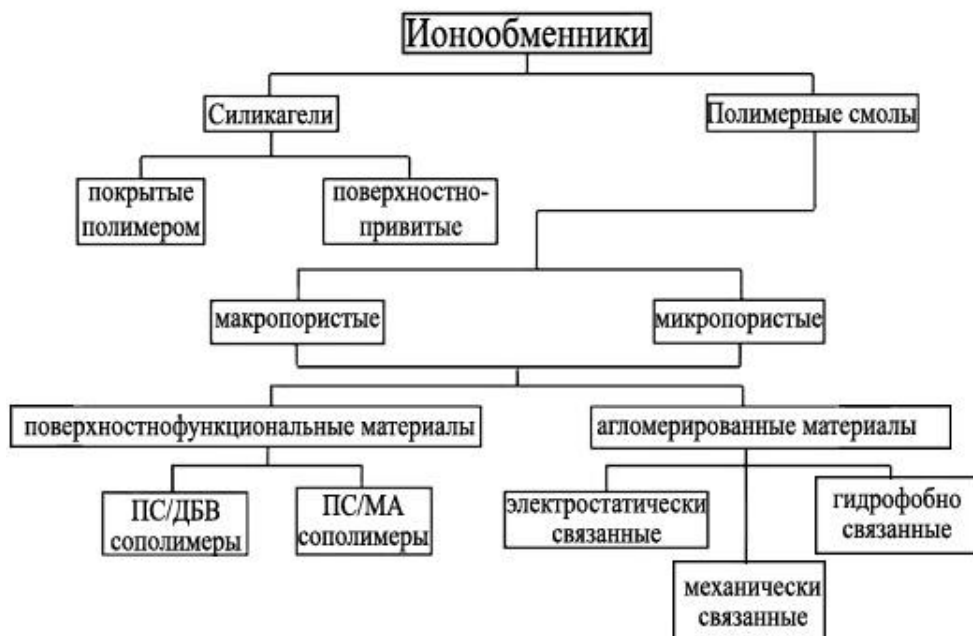


Рисунок 21 Наиболее распространенные неподвижные фазы в ионной хроматографии. ПС – поверхностно-связанные; ДВБ – дивинилбензол; МА – метилметакрилат.

Практика выбора сорбентов и критерии их качества

Хроматографические носители - сорбенты подбирают так, чтобы в процессе хроматографирования можно было бы обеспечить наибольшее различие в термодинамических свойствах разделяемых компонентов, с одной стороны, и максимально быстрое достижение равновесия в каждом акте хроматографического разделения, с другой. Чем строже выполняются эти требования, тем выше разрешающая способность хроматографии.

Хроматографическая система должна обеспечивать:

высокую эффективность разделения (это условие диктует верхний предел размеров зерен сорбента, величину коэффициентов диффузии ионов внутри сорбента);

экспрессность анализа (в условиях ионной хроматографии требование экспрессности анализа приводит к необходимости снижать емкость разделяющего ионообменника);

воспроизводимость результатов анализа (ионообменники должны быть стойкими к физическому разрушению и химическим воздействиям в процессе эксплуатации);

надежность и полноту анализа (должно быть исключено взаимовлияние компонентов, все разделяемые ионы должны участвовать в ионном обмене преимущественно в линейной области изотермы сорбции, т.е. сорбенты должны иметь функциональные группы с умеренной селективностью и доступные для любого компонента смеси);

низкие пределы обнаружения ионов (чувствительность системы зависит от количества разделяющего сорбента: для увеличения чувствительности объем сорбента стремятся уменьшить).

Из описания равновесия и кинетики ионохроматографических процессов следуют рекомендации относительно физико-химических свойств сорбентов.

1. Заряд и природа функциональных групп. Знак заряда определяет вид ионита: "-" соответствует катиониту, "+" соответствует аниониту. Как правило, функциональные группы - это либо анионы многоосновных кислот, либо однозарядные катионы соответствующих оснований. По степени диссоциации функциональные группы бывают сильно-, средне- или слабо-кислотными или -основными для катионитов и анионитов соответственно. По избирательности взаимодействия с ионами (т.е. по величине констант ионного обмена) иониты могут быть селективными к определенным группам ионов (например, если константа обмена превышает 100) и умеренно селективными к большому ряду ионов. Например, все слабокислотные катиониты селективны к иону водорода, слабоосновные аниониты - к гидроксид-иону. Напротив, сильнокислотные катиониты или высокоосновные аниониты являются умеренно селективными по отношению к большому числу ионов: к катионам щелочных, щелочноземельных, переходных металлов; анионам карбоновых кислот, неорганических бескислородных и кислородсодержащих кислот и т.п.

Как правило, селективность ионообменных сорбентов определяется двумя факторами. С одной стороны, при обычном типе обмена (например, катионы на катионите) селективность может быть обусловлена точным соответствием размеров пор сорбента размеру радиуса гидратированного иона элемента: ионы с большими радиусами не входят в объем зерна ионита (ситовой эффект), а ионы слишком малых размеров характеризуются меньшей энергией сорбции. Такой эффект проявляется тем в большей степени, чем меньше набухаемость сорбента.

С другой стороны, селективность ионообменных сорбентов может быть обусловлена и химическим взаимодействием компонентов с функциональными группами ионита, например комплексообразованием металлов, появлением помимо ионной дополнительной координационной связи с атомами функциональных групп.

2. Основа сорбента. Сорбенты для ионной хроматографии получают модифицированием кремнезема, сополимера стирол-дивинилбензола и полиметакрилата. Свойства сорбентов во многом определяются их матрицей.

Хотя матрица полимерного ионита или другая основа сорбента неорганической природы не участвует непосредственно с межйонным взаимодействием, используемом в ионной хроматографии, тем не менее они придают сорбенту свойства твердой фазы, что в гетерофазном процессе имеет существенное значение, в том числе и при установлении равновесия ионного обмена. На равновесные свойства сорбента оказывают влияние эластичность или жесткость каркаса ионита в области, насыщенной функциональными группами, что в свою очередь связано с количеством сшивающего агента. Действительно, гидратные оболочки ионов стремятся увеличить объем вмещающего полимера, который в силу определенной жесткости связей противодействует этому процессу, что отражается на величинах характеристик равновесия - констант ионного обмена.

Большое значение имеет матрица сорбента при определении гидрофобных сильноудерживаемых ионов. Для их определения следует использовать сорбенты с менее гидрофобными матрицами. Показано, что при определении сильно удерживаемых катионов щелочноземельных металлов, а также неорганических анионов (I^- , $S_2O_3^{2-}$, SCN^- , ClO_4^-) лучше использовать сорбенты на основе кремнезема или полиметакрилата. На этих сорбентах ионы удерживаются слабее, чем на стирол-

дивинилбензольных. Это объясняется различной гидрофобностью матрицы, которая возрастает в ряду: кремнезем <полиметакрилат<стирол-дивинилбензол. Поэтому для определения гидрофобных ионов надо выбирать менее гидрофобные матрицы.

Основа сорбента должна также обладать необходимой по условиям его эксплуатации прочностью и химической стойкостью. При прочих равных условиях большей прочностью обладают сферические (овальные) гранулы сорбента, а также более сшитые полимеры. Рекомендуют использовать более сшитые полимеры, химическая устойчивость которых убывает в ряду: С/ДВБ (сополимер стирола и дивинилбензола) > ПМА (полиметакрилатный гель) > СГ (силикагель или пористое стекло).

Сорбенты на основе кремнезема устойчивы лишь при pH 2 - 7, поэтому их применяют только в одноколоночном варианте с нейтральными элюентами. Сорбенты на полимерной основе устойчивы при pH 1 - 13, поэтому их можно использовать как в одноколоночном, так и в двухколоночном вариантах.

3. Обменная ёмкость. Способность к ионному обмену обеспечивается наличием в сорбентах химически активных групп с подвижными обмениваемыми ионами. Их концентрацию в мэкв/г (или мэкв/мл) сорбента называют полной обменной емкостью (ПОЕ) ионита.

Основным критерием выбора обменной емкости сорбента является относительное удерживание определяемых ионов. Для определения слабо удерживаемых ионов нужны сорбенты с большей емкостью, а для определения сильно удерживаемых - с меньшей. Количественно оценить емкость сорбента необходимую для быстрого и селективного разделения, можно по уравнению:

$$t'_R = K_{и.о.} \frac{QV_S}{C_{эл.}F} \quad (48)$$

где t_R' - приведенное (исправленное) время удерживания, $K_{и.о.}$ - константа ионного обмена, Q - удельная обменная емкость сорбента, V_s - объем сорбента, $C_{эл.}$ - концентрация элюирующего иона, F - объемная скорость расхода элюента.

На практике изменение обменной емкости сорбента для оптимизации используют редко. Чаще оптимальные условия находят изменением состава и свойств элюента.

4. Зернение сорбента. Эффективность разделения зависит от размера частиц сорбента. Чем меньше размер частиц, тем выше эффективность. С другой стороны, эффективность разделения зависит от однородности фракции сорбента. Чем меньше различие в размере частиц, тем меньше «вихревая» диффузия и выше эффективность. Добиться однородности фракции при очень малом размере частиц (~5 мкм) очень сложно. Оптимальный размер частиц сорбентов для ионной хроматографии от 10 до 20 мкм с дисперсией по фракции не более $\pm 20\%$. Использование таких сорбентов позволяет добиться высокой эффективности разделения при относительно невысоком давлении.

В качестве разделяющих, как правило, используют колонки длиной от 50 до 250 мм и диаметром 3 - 5 мм. Увеличивая длину колонки, можно повысить эффективность разделения, поскольку увеличится число теоретических тарелок приходящихся на колонку. Однако следует помнить, что при этом увеличатся времена удерживания ионов вследствие увеличения объема сорбента. Иначе говоря, при увеличении длины колонки надо пропорционально увеличивать концентрацию элюирующего иона или использовать более сильный элюент.

5. Коэффициент диффузии - один из важнейших кинетических параметров. Он зависит как от свойств диффундирующих ионов, так и от свойств твердой фазы - пористости (распределения пор в зернах сорбента по протяженности и диаметру канала), извилистости поровых каналов.

Высокой эффективности разделения соответствуют большие величины коэффициентов диффузии. Поэтому в качестве разделяющих сорбентов предпочтительны макропористые полимерные иониты с не очень большими значениями локальных коэффициентов распределения для рассматриваемых ионов.

6. Строение ионитов. Существует ряд ионообменников, удовлетворяющих большинству из приведенных выше требований. Они успешно применяются в ионной хроматографии. Функциональные группы таких сорбентов имеют умеренную селективность по отношению к широкому кругу катионов и анионов (сульфогруппы, фосфорнокислые группы, четвертичные аммониевые основания) и располагаются в тонком поверхностном слое сорбентов, что удовлетворяет требованию к структуре зерен. Зерна, преимущественно сферической формы, имеют размеры от 7 ± 2 до 30 ± 5 мкм. Выбор таких мелких зерен способствует быстрому протеканию внешней диффузии. Материалы, используемые для приготовления сорбентов, например сополимер стирола с дивинилбензолом (С/ДВБ), силикагель (СГ), пористое стекло, полиметилметакрилатный гель (ПМА), выдерживают давление до 10 - 20 МПа, а давление в ионных хроматографах обычно не превышает 10 МПа. Емкость сорбентов 1 - 50 мкэкв/мл, что обычно обеспечивает длительность анализа не более чем 20 мин.

Известны три принципиально различных способа получения разделяющих сорбентов для ионной хроматографии, функциональные группы которых расположены в поверхностном слое:

- 1) химическая прививка функциональных групп к поверхности полимерной основы сорбента с предварительной маскировкой внутренней части зерна (фирма "Biotronik") или без таковой ("Wescan");
- 2) механическое приклеивание субмикронных частиц ионита к поверхности инертного носителя ("Dionex");
- 3) нанесение тонкого активного слоя на инертную основу с после-

дующей химической прививкой функциональных групп к активному слою (МГУ, "Vydaк", "Toyo Soda"). В качестве основы для получения таких сорбентов обычно используют сополимер стирола с ДВБ различной степени сшивки, полиметилметакрилатный гель, силикагель с площадью поверхности порядка 10^2 м²/г, пористое стекло.

По первому способу на основе сополимера стирола с ДВБ 4% сшивки фирма "Dionex" (США) получает сульфокатионит, а фирмы "Biotronik" (Германия) и "Wescan" (США) на той же основе получают высокоосновный поверхностно-привитой анионит. По второму способу фирма "Dionex", Институт химии АН Эстонии готовят разделяющий анионит, причем во втором случае вместо сополимера берут полиметилметакрилатный гель с размером частиц 25-40 мкм. В обоих случаях активный слой формируется из субмикронных (0.1-0.5 мкм) частиц высокоосновного анионита. По третьему способу на основе гидрофобизированного силикагеля ("Vydaк", США) и пористого стекла ("ToyoSoda", Япония) получают катиониты и аниониты для одноклоночного варианта ионной хроматографии. По первому способу в Институте макромолекулярных соединений АН Чехии синтезирован анионит, обладающий повышенной селективностью к ионам нитрата и бромида. Его получают путем аминирования и иодметилирования полиметилметакрилатного геля. Сорбент такого типа - "Aniex" выпускается фирмой "Вагос" (Эстония). Методики получения указанных сорбентов для ионной хроматографии по понятным соображениям освещены в литературе недостаточно полно, поэтому приводить их здесь вряд ли целесообразно.

При использовании сильно кислых или сильно щелочных сред предпочтительна основа из сополимера стирола с ДВБ. Наименее надежен и воспроизводим в этом смысле вышеописанный второй способ. Сополимер является активной основой, что затрудняет его использование в третьем способе. Следовательно, для получения химически стойких воспроизводимых

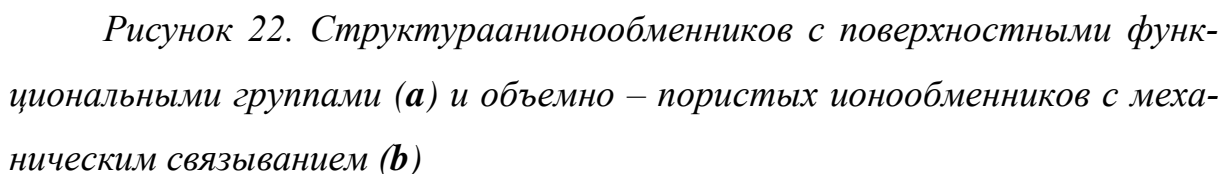
сорбентов наиболее предпочтителен первый способ с основой из сополимера.

Поверхностно-привитые иониты (ППИ) по основным параметрам удовлетворяют требованиям к разделяющим сорбентам для ионной хроматографии. Их достоинства - доступность функциональных групп, расположенных в тонком приповерхностном слое зерен; поэтому внутридиффузионные процессы протекают быстро. При таком расположении функциональных групп достигается также малая емкость слоя ионита.

Центрально-привитые иониты (ЦПИ) – сравнительно новый тип сорбента для хроматографии. Зерно ЦПИ в центральной части имеет ядро с ионообменными функциональными группами, которое окружено слоем полимера, инертного по отношению к обмениваемым ионам. Полимерный слой вокруг ядра должен, во-первых, придать зерну необходимую жесткость и достаточно большие размеры, чтобы предотвратить чрезмерное гидродинамическое сопротивление слоя, во-вторых, обеспечить быстрый транспорт ионов к ионообменному ядру и равномерно распределить поток ионов на границе с ядром, в-третьих, уменьшить емкость слоя сорбента до требуемых значений.

Первое и третье свойства появляются автоматически, если частицы ионита покрыть полимерным (или иным, достаточно прочным) слоем необходимой толщины и не имеющим сродства к разделяемым ионам. Чтобы иметь возможность быстро транспортировать ионы к ядру, инертная оболочка должна представлять собой пористую гидрофильную мембрану. Наиболее приемлем в принципиальном плане для создания ЦПИ способ, заключающийся в химической модификации поверхностного слоя зерна. Если взять в качестве исходного материала ионит, подходящий по свойствам для ядра, а по размерам, соответствующий зернам будущего сорбен-

В настоящее время в ионной хроматографии применяются два типа неподвижных фаз: ионообменники с функциональными группами на поверхности и объемно-пористые ионообменники. В первом типе материалов функциональные группы расположены непосредственно на поверхности полимера или в его порах; объемно-пористые материалы имеют очень маленькие частицы (также с функциональными группами на поверхности), которые присоединены к центральной частице, имеющей большие размеры. Это присоединение может быть осуществлено либо за счет механических, либо за счет гидрофобных или электростатических взаимодействий. На рисунке 22 показаны два варианта примеров для этих двух типов материалов, применяемых в качестве анионообменников.



Объемно-пористые насадочные колоночные материалы обладают большой хроматографической эффективностью, поскольку диффузионные пути сохраняются очень короткими, благодаря большому расстоянию между функциональными группами и материалом основания; именно это способствует большой скорости массопереноса. Однако, химическая стабильность этих разделительных фаз значительно меньше, чем стабильность материалов с поверхностными функциональными группами. Обычно используемые в анионной хроматографии функциональные группы получают превращением якорных (закрепленных одним концом) групп с помощью подходящего амина. Этот процесс генерирует аммониевые ионы, которые зафиксированы на поверхности полимера. Функциональные группы, содержащие атомы азота, в подавляющем большинстве случаев, являются почти единственными, которые используются для разделений анионов в ионной хроматографии. Это объясняется, главным образом, их хорошей химической стабильностью и почти неограниченным числом возможных заместителей у атома азота.

Аммониевые группы генерируются на поверхности полимера конвертированием якорной группы с помощью действия амина. Алкильные остатки у положительно заряженного атома азота могут варьироваться в широком диапазоне. В простейшем случае происходит образование $R-NH^+$ и первичного иона аммония. Однако при высоких величинах pH этот ион может депротонироваться и терять свой заряд. Для этого типа насадочного материала обменная емкость зависит от pH элюента, именно поэтому они называются слабоосновными. Если проводится последовательное замещение алкильными группами, то сначала образуются вторичные и затем третичные аммониевые группы; эти группы также могут подвергаться депротонизации. Только тогда, когда все радикалы состоят из алкильных групп, обменная емкость или заряд не зависят от величины pH элюента и получается сильноосновный четвертичный анионообменник. В хроматографии обычно-

стремятся к независимости от pH обменной емкости, именно по этой причине используются только полностью алкилированные материалы. Для специальных хроматографических применений, таких как анализ белков или методики с предварительным концентрированием образца, часто используются слабоосновные иониты.

В катионной хроматографии применяются как материалы на основе силикагеля, так и материалы на основе полимеров. В противоположность анионной хроматографии (щелочные элюенты), условия работы в катионной хроматографии позволяют использовать силикагели. Катионообменники на основе силикагеля делятся на различные классы материалов: катионообменники с прямым присоединением функциональных групп и катионообменники с полимерным покрытием.

Первые из вышеуказанных катионитов обладают хорошей хроматографической эффективностью. Однако из-за большого различия величин констант ионного обмена катионов щелочных и щелочноземельных элементов они непригодны для одновременного определения таких ионов. В случае силикагелей с полимерным покрытием, силикатная поверхность покрывается «предполимером», который затем иммобилизуется с помощью поперечной сшивки. На практике многочисленные типы ионитов могут быть получены с помощью последующего введения функциональных групп.

Существует большое число ионообменников на основе силикагеля. Одним из наиболее частых приложений является одновременное разделение щелочных и щелочноземельных металлов; также возможно разделение ионов переходных и тяжелых металлов. Тем не менее, некоторые недостатки препятствуют универсальному использованию ионообменников, основанных на силикагелях:

- При $\text{pH} < 2$ связь между кремниевой матрицей и функциональными группами становится значительно слабее. Это приводит к постепенному "уносу" функциональных групп и потере обменной емкости.

- При $\text{pH} > 7$ значительно увеличивается растворимость силикагеля. Этот процесс приводит к потере механической стабильности насадочного материала колонки. При этом происходит —проседание частиц колонки и, соответственно, образование мертвого объема в начальной зоне колонки.

В катионообменниках на основе органических полимеров в качестве матриц в основном применяются смолы, которые получены сополимеризацией стирола и дивинилбензола. Ограничения, упомянутые выше для силикагелей, для этих материалов отсутствуют. Смолы могут использоваться во всем диапазоне pH от 0 до 14, они также инертны по отношению к фторидам. Хотя их устойчивость к разрушению под воздействием высокого давления меньше устойчивости силикагелей, тем не менее, за исключением нескольких полиметакрилатных смол, их устойчивость в общем вполне достаточна для практических целей.

Помимо смол непосредственно введенными функциональными группами, в настоящее время также доступны пелликулярные катионообменники. Они обладают двухслойной структурой, поскольку невозможно получить полностью аминированные частицы субстрата. Именно поэтому полностью сульфированные частицы субстрата вначале окружаются аминированным слоем и затем слоем сульфированных латексных частиц. Фиксация проводится за счет электростатических и Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий.

Небольшой диаметр латексных частиц позволяет уменьшить диффузионные пути и, соответственно, ускорить процессы обмена и получить высокую эффективность для разделительных колонок с таким типом насадки. Недостатком пелликулярных материалов является их чувствительность к действию органических растворителей, а также подвижных фаз с высокой ионной силой, поскольку в этом случае происходит постепенное вытеснение латексных частиц. Возможно одновременное определение щелочных и щелочноземельных металлов при использовании модифицированного ва-

рианта материала, в котором ковалентно присоединен аминированный слой. Однако различие в селективности для ионов калия, магния и кальция превышают необходимые величины, так что для проведения анализа требуется относительно большое время опыта.

Наименование и некоторые свойства полимерных ионообменников для ионной хроматографии приведены в таблице 2.

Таблица 2. Полимерные ионообменники для ионной хроматографии

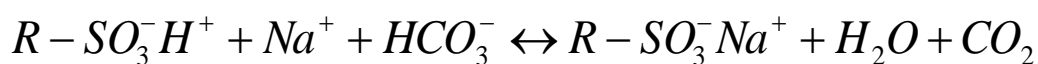
Наименование	Диаметр частиц, мкм	Функциональная группа	Ионообменная емкость ммоль экв/г	Степень сшивки, %
АльтексОА – 1000	12	$-(\text{SO}_3)^-$	-	-
Альтекс Анион НС	12	$-(\text{NH}_3)^+$	3	-
Аминекс А-27	6-15	$-(\text{NH}_3)^+$	3.2	8
Аминекс А-28	7-11	$-(\text{NH}_3)^+$	3.2	8
АН-Х	11	-	4	2,4,8,12
Аминекс А-5	11-15	$[\text{N}(\text{CH}_3)_3]^+\text{Cl}^-$	5	8
Аминекс А-7	7-11	$-(\text{SO}_3)^-$	5	8
Аминекс А-8	5-8	$-(\text{SO}_3)^-$	5	8
Аминекс А-5	11-12	$-(\text{SO}_3)^-$	5	8
Бекман АА-15	11	$-(\text{SO}_3)^-$	5	8
Бекман АА-20	11	$-(\text{SO}_3)^-$	5	8
Гамильтон НА	7-10	$-(\text{SO}_3)^-$	5	4,6,8,10
Гамильтон НС	7-10	$-(\text{NR}_3)^+\text{Cl}^-$	5.2	2-35
Даррум ДС А	14	$-(\text{SO}_3)^-$	5	8
Даррум ДС 6А	11	$-(\text{SO}_3)^-$	5	8
ИонексSB	5-20	$-(\text{SO}_3)^-$	3	7

ИонексSA	10	$-(NR_3)^+Cl$	3	8
Ионопак	10	$-(SO_3)^-$	3-5	-
Сферон ДЕАЕ	10,16,20	$-(SO_3)^-$	1.5	-
Сферон микро С300	10,16,20	$-N(C_2H_5)_3^+$	2.0	-
СферонВ300	10,16,20	$-COOH$	1.5	-
Хромэкс	11-12	$[N(CH_3)_3]^+Cl$	4	2,4,8,12
Хромэкс катион	11	$-(SO_3)^-$	4	8, 12

Подвижные фазы (элюенты) в ионной хроматографии

Если в ионной хроматографии с кондуктометрическим детектированием в качестве элюентов используют растворы сильных электролитов, тогда для снижения их фоновой электропроводности после разделяющей (аналитической) колонки устанавливают вторую колонку – подавляющую (компенсационную). В этом случае ионы, получающиеся за счет реакций обмена анионов (или катионов) элюента на подавляющей колонке (заполненной соответственно катионитом или анионитом с H^+ и OH^- - противоионами), образуют воду или другой слабопроводящий элюат. Последний содержит определяемые аналиты в форме свободных сильных кислот или оснований. Такой вариант получил название двухколоночной ионной хроматографии.

Ниже в качестве примера рассмотрен принцип химического подавления в анионной хроматографии при элюировании Cl^- - ионов раствором $NaHCO_3$. Подавляющая колонка заполнена сульфокатионитом большой обменной емкости в H^+ -форме.



катионит

элюент

матрица элюата



катионит

анализируемый раствор

противоионаналит

(аналит – Cl^-) (кондуктометрический детектор)

Важными достоинствами двухколоночной ионной хроматографии являются низкие пределы обнаружения ионов и линейность градуировочной зависимости в широком интервале их концентраций.

Элюенты, используемые в двухколоночной ионной хроматографии, должны отвечать двум основным требованиям. Во-первых, они должны быстро и селективно разделять определяемые ионы в разделяющей колонке. Во-вторых, после прохождения подавляющей системы элюент должен превращаться в соединение, электропроводность которого максимально отличается от электропроводности определяемого иона. Как правило, элюент подбирают такой, чтобы время удерживания наиболее сорбируемого определяемого иона не превышало 20—25 мин. Выбор элюента зависит от числа и характера определяемых ионов. Концентрация элюентов для двухколоночной ионной хроматографии обычно колеблется от 1 до 10 мМ. Низкая концентрация элюента связана, во-первых, с низкой емкостью разделяющих ионообменников, поэтому для селективного разделения необходимы элюенты низкой концентрации, а, во-вторых, с временем работы подавляющей системы: чем меньше концентрация элюента, тем больше время работы подавляющей системы между регенерациями.

Анионная хроматография

Наиболее распространенными элюентами в двухколоночной ионной хроматографии анионов являются разбавленные растворы солей слабых кислот. Эти элюенты используют для определения анионов сильных кислот, pK которых ниже 5. При этом в подавляющей системе элюент переводят в малодиссоциированную кислоту, имеющую низкую электропроводность, а определяемые анионы — в сильную кислоту, имеющую высокую электропроводность.

Для определения анионов слабых кислот, pK которых выше 6, в качестве элюентов используют разбавленные растворы солей сильных кис-

лот. В этом случае в подавляющей системе определяемый анион переводят в малодиссоциированную кислоту, а элюент — в сильную кислоту с высокой электропроводностью. Детектирование проводят по уменьшению кондуктометрического сигнала.

Выбор оптимального элюента обусловлен в первую очередь тем, какие ионы нужно определить. Традиционно считается, что для разделения наиболее подходят элюенты, элюирующие ионы которых имеют несколько большую сорбционную способность, чем наиболее прочно удерживаемый компонент анализируемой смеси. По сорбционной способности ионы условно можно разделить на три группы: слабо-, средне- и сильноудерживаемые. Количественную оценку удерживания можно провести по константам ионного обмена элюирующих ионов относительно какого-либо иона, принятого за "стандартный". Этому же принципу придерживаются и при характеристике элюентов по их элюирующей силе. В таблице 3 приведены элюенты, используемые в двухколоночной ионной хроматографии анионов.

Таблица 3. Элюенты, используемые в двухколоночной ионной хроматографии

Элюент	Элюирующий анион	Элюирующая способность
NaOH	OH ⁻	низкая
Na ₂ B ₄ O ₇	BO ₂ ⁻	низкая
Na ₂ CO ₃	CO ₃ ²⁻	средняя
NaHCO ₃ /Na ₂ CO ₃	HCO ₃ ⁻ , CO ₃ ²⁻	средняя
Na ₂ CO ₃ /NaOH	CO ₃ ²⁻ , OH ⁻	высокая
NaNO ₃ /NaOH	NO ₃ ⁻ , OH ⁻	средняя
C ₆ H ₅ ONa	C ₆ H ₅ O ⁻	средняя
Аминокислота	H ₂ NR ⁻ COO ⁻	зависит от свойств кислоты

Уравнение, описывающее изократическое элюирование (состав и скорость подачи элюента не меняются), упрощенно выглядит следующим образом:

$$\log K = -(A/E)\log C_{\text{эл}} + b \quad (49)$$

где K – фактор удерживания, A и E – величины зарядов определяемого и элюирующего ионов; b – постоянная величина, пропорциональная константе ионного обмена и емкости колонки; $C_{\text{эл}}$ – концентрация элюирующего иона.

В двухколоночном варианте ионной хроматографии при определении слабоудерживаемых анионов (фторид, нитрит, хлорид, сульфид, анионы монокарбоновых кислот и др.) наиболее оптимальными элюентами, обеспечивающими высокую селективность разделения, служат растворы гидрокарбоната, бората и гидроксида натрия.

Для разделения анионов, обладающих средней сорбционной способностью (нитрат, сульфат, сульфит, дигидрофосфат, анионы дикарбоновых кислот и др.), целесообразно использовать элюенты со средней элюирующей силой. К таким элюентам относятся растворы, содержащие в качестве элюирующих ионы карбоната, гидрофталата, фенолята и др. Некоторые из этих элюентов позволяют селективно разделять и отдельные группы слабоудерживаемых анионов.

Следует отметить, что быстрое и селективное разделение смеси, содержащей слабо- и среднеудерживаемые анионы, достигается только в том случае, если смесь содержит не более четырех слабоудерживаемых компонентов, а их сорбционные свойства достаточно различаются. При определении сильноудерживаемых анионов (иодид, тиоцианат, сульфат, полифосфаты, анионы дикарбоновых и трикарбоновых кислот и др.) целесообразно использовать элюенты, обладающие высокой элюирующей силой – растворы с высокой концентрацией карбонат-ионов, тирозина, фталата, салицилата и др.

Следует отметить, что деление элюентов по их элюирующей силе весьма условно, поскольку некоторые из перечисленных элюентов являются эффективными при разделении как слабо-, так и средне- и сильноудерживаемых ионов. Как видно из вышеприведенного уравнения, элюирующая сила элюента обусловлена не только сорбционными характеристиками элюирующих ионов, но и зависит от их концентрации. Изменяя концентрацию элюента, можно регулировать его элюирующую силу. На этом принципе основано градиентное элюирование.

Так как основой большинства применяющихся в ионной хроматографии элюентов служат соли слабых кислот и оснований, то регулировать их элюирующую силу можно, изменяя pH растворов. Наглядным примером увеличения элюирующей силы элюента с ростом его pH может служить использование растворов карбонатов для разделения анионов. Раствор гидрокарбоната является слабым элюентом и служит для разделения слабоудерживаемых анионов. Повышение pH раствора приводит к увеличению содержания в нем карбонат-ионов, обладающих высокой элюирующей силой. В смешанной гидрокарбонат-карбонатной форме элюент служит для разделения среднеудерживаемых ионов, а карбонатная форма элюента, существующая при высоких значениях pH, элюирует сильно удерживаемые анионы. Изменение элюирующей силы элюента в зависимости от величины pH его раствора может служить основой градиентного способа ионохроматографического анализа.

Вместе с тем, использование карбонатного элюента вызывает ряд сложностей, связанных с детектированием аналитов на фоне раствора угольной кислоты. К таким сложностям относятся наличие на хроматограмме отрицательных водного и карбонатного пиков, затрудняющих определения слабоудерживаемых анионов, а также узкий диапазон линейности градуировочного графика, связанный с подавлением диссоциации угольной кислоты в зоне определяемого аниона, и ряд других. Многие из указанных

сложностей можно устранить, используя в качестве элюентов растворы аминокислот. В этом случае детектирование осуществляется на фоне де-ионизованной воды, что повышает чувствительность определения.

При использовании элюентов с низкой электропроводностью кондуктометрический детектор присоединяют непосредственно к разделяющей колонке. Такой вариант называется одноколоночной ионной хроматографией. Элюенты, используемые в одноколоночной ионной хроматографии, должны быстро и селективно разделять определяемые ионы, иметь низкую электропроводность и максимальное различие величин эквивалентной электропроводности элюирующего и определяемого ионов. Элюенты, отвечающие этим требованиям, могут быть использованы и в системах с косвенным УФ-детектированием.

Для определения анионов способом одноколоночной ионной хроматографии в качестве элюентов обычно выбирают растворы органических кислот или их солей. Анионы этих кислот имеют высокое сродство к разделяющему сорбенту, поэтому быстрое и селективное разделение достигается при низких концентрациях элюирующего иона. Большинство органических кислот, используемых в качестве элюентов в одноколоночной ионной хроматографии анионов, представлены ниже:

- Сульфаниловая
- Никотиновая
- Пиколиновая
- Лимонная
- Янтарная
- Фумаровая
- Сульфосалициловая
- п-Аминобензойная
- Бензолсульфоновая

- 3,5 –Диоксибензойная
- Дипиколиновая
- 2,4 – Диоксибензойная
- 1,3,5 – Бензолтрикарбоновая
- Фталевая
- Бензойная
- Салициловая
- п-Нитробензойная

Кислоты расположены в порядке увеличения их элюирующей способности

Все вышесказанные элюенты эффективны при определении анионов сильных кислот и кислот средней силы и не годятся для определения анионов слабых кислот, таких как цианид, борат, арсенит и силикат, существующих в растворе только при больших величинах рН. Для определения таких анионов в качестве элюента используют гидроксиды натрия или калия. Поскольку гидроксид- ион имеет бóльшую эквивалентную электропроводность, чем другие анионы, детектирование проводят по отрицательным пикам. Иными словами, при прохождении зоны образца через детектор наблюдается снижение электропроводности, равное разности между проводимостью определяемого аниона и эквивалентно вытесненного гидроксида. Разделение необходимо проводить на полимерных сорбентах, поскольку силикагель в щелочной среде разрушается.

Катионная хроматография

В двухколоночной ионной хроматографии катионов, как и при определении анионов, используют два варианта детектирования. В первом из них, наиболее распространенном, элюент в подавляющей системе переводят в соединение с низкой электропроводностью, а определяемые катионы — в соединения с высокой электропроводностью. Этот вариант детектиро-

вания используют для определения катионов щелочных, щелочноземельных и некоторых переходных металлов. В качестве элюентов используют разбавленные растворы сильных кислот, а также солей слабых оснований, серебра, бария, свинца, цинка. Для определения слабо удерживаемых катионов щелочных металлов пригодны элюенты с низкой элюирующей силой, а для определения сильно удерживаемых катионов щелочноземельных и переходных металлов необходимы элюенты с высокой элюирующей силой.

Во втором варианте детектирования элюент переводят в соединение с высокой электропроводностью, а определяемый катион — в соединение с низкой электропроводностью. Этот вариант применяют для определения катионов слабых оснований, в частности аминов.

Элюенты, используемые в двухколоночной ионной хроматографии катионов, приведены в таблице 4.

Таблица 4. Элюенты, используемые в двухколоночной ионной хроматографии катионов

Элюент	Элюирующий катион	Элюирующая способность
HNO_3	H^+	низкая
AgNO_3	Ag^+	средняя
Фенилендиамин $\times 2\text{HCl}$	ФДАH_2^{2+}	высокая
BaCl_2	Ba^{2+}	высокая
$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	Pb^{2+}	высокая
$\text{Zn}(\text{NO}_3)_2/\text{HNO}_3$	$\text{Zn}^{2+}, \text{H}^+$	высокая
KCl/HCl	K^+, H^+	средняя
Аминокислота $+\text{HCl}$	$\text{H}_3\text{N}^+\text{RCOOH}$	зависит от состава кислоты

Следует отметить, что двухколоночный вариант применяют, в основном, для определения катионов щелочных и щелочноземельных металлов, используя растворы сильных кислот или солей слабых оснований в качестве элюентов.

Слабые элюенты применяют при разделении моновалентных катионов, характеризующихся невысокими константами обмена, например катионов щелочных металлов, некоторых аминов. Такими элюентами, как правило, служат разбавленные растворы минеральных кислот, соли некоторых слабоудерживаемых катионов, например лития, моноаминов, аминокислот и др.

К элюентам со средней элюирующей силой, используемыми при разделении алифатических аминов и катионов некоторых двухвалентных металлов, можно отнести растворы солей некоторых среднеудерживаемых моноаминов, диаминов и аминокислот. Определения сильноудерживаемых катионов, например щелочноземельных и переходных металлов, осуществляется с применением в качестве элюентов растворов, содержащих двухзарядные катионы этилендиамина, фенилендиамина, аргинина, гистидина, диаминопропионовой кислоты, некоторых двухвалентных металлов.

При определении катионов щелочных металлов и аммония способом одноколоночной ионной хроматографии, как правило, используют разбавленные (~ 1 мМ) растворы азотной или соляной кислот. Поскольку эквивалентная электропроводность ионов водорода наибольшая, детектирование проводят по уменьшению электропроводности элюента при прохождении через детектор зоны определяемого катиона.

Для определения катионов щелочноземельных и переходных металлов в качестве элюентов, применяют соли этилен- или фенилендиамина. В этом случае, как и при определении анионов, на хроматограмме появляется дополнительный пик. Связано это, по-видимому, с сорбцией и десорбцией диамина матрицей катионообменника при перемещении зоны определяемого катиона по колонке. Для повышения селективности разделения и сокращения времени определения двухзарядных катионов в качестве элюентов используют диаммониевые соли комплексообразующи-

манионом винной, α -оксиизомасляной и других кислот. Комплексообразующий анион смещает ионообменное равновесие, частично образуя либо незаряженный, либо меньшего заряда комплекс. Это приводит к уменьшению коэффициента распределения иона металла и времени его удерживания. Соответствующий анион, а также концентрацию и pH элюента следует выбирать таким образом, чтобы связь ионов в комплексе была достаточно слабой. Если устойчивость комплекса высока, то время удерживания катионов будет слишком мало и разделение не произойдет.

В настоящее время для детектирования анионов переходных и тяжелых металлов часто используется способ постколоночной дериватизации. Основа такого способа заключается в том, что после выхода из колонки элюат смешивается с металлохромным реагентом в постколоночном реакторе. Этот реагент взаимодействует с определяемыми ионами металлов с образованием окрашенных комплексов. В качестве таких реагентов часто применяются азокрасители.

Капиллярный электрофорез

Метод капиллярного электрофореза (КЭ) основан на разделении компонентов сложной смеси в кварцевом капилляре под действием приложенного электрического поля. Микрообъем анализируемого раствора вводят в капилляр, предварительно заполненный подходящим буфером – электролитом. После подачи к концам капилляра высокого напряжения (до 30 кВ), компоненты смеси начинают двигаться по капилляру с разной скоростью, зависящей в первую очередь от заряда и массы (точнее – величины ионного радиуса) и, соответственно, в разное время достигают зоны детектирования. Полученная последовательность пиков называется электрофореграммой, при этом качественной характеристикой вещества является параметр удерживания (время миграции), а количественной – высота или площадь пика, пропорциональная концентрации вещества. На рисунке 22 показана схема установки для капиллярного электрофореза.

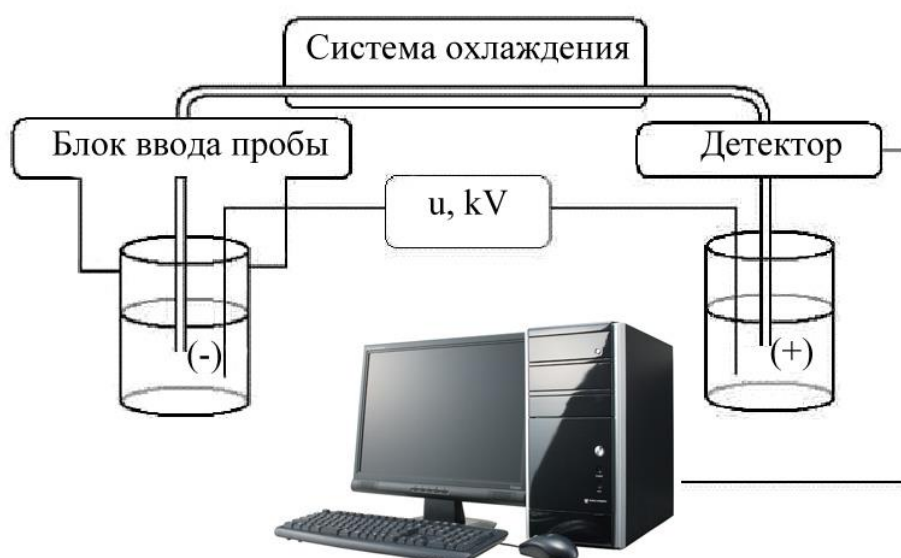


Рисунок 22 Схема установки для капиллярного электрофореза

На заряженную частицу в простейшем случае действуют две противоположно направленные силы – электростатического притяжения и сопротивления движению частицы. В равновесных условиях действие этих сил уравнивает друг друга, и скорость миграции частицы определяется выражением:

$$\mu = \frac{qE}{\eta r} \quad (50)$$

где q – заряд иона, а E – напряженность электрического поля. η – вязкость среды, r – радиус частицы

Электрофоретическая подвижность $\mu_{\text{эф}}$ определяется как скорость движения частицы, деленная на напряженность электрического поля:

$$\mu_{\text{эф}} = \frac{V_{\text{эф}}}{E} \quad (51)$$

где, $V_{\text{эф}}$ – скорость идеализированной сферической частицы.

При проведении разделения в капиллярах особенно важное значение приобретает электроосмотический поток (ЭОП), связанный с движением диффузной части двойного слоя, образующегося относительно заряженной поверхности внутренней стенки капилляра (рисунок 23).

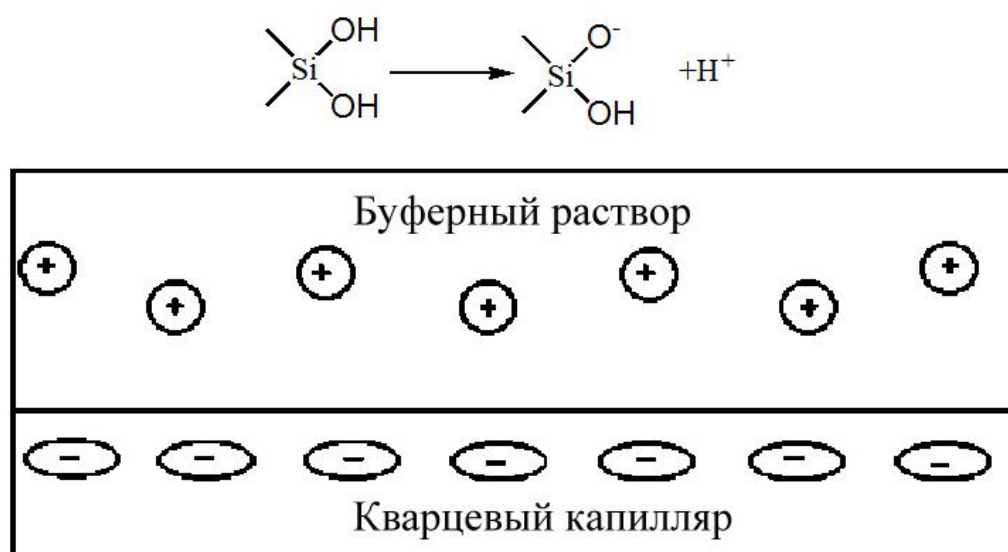


Рисунок 23 Схема возникновения электроосмотического потока

Как правило, заряд поверхности определяется наличием отрицательно заряженных силанольных групп на поверхности немодифицированных кварцевых капилляров или создается за счет дополнительной модификации поверхности. Результирующая подвижность частиц μ определяется суммой электрофоретической и электроосмотической подвижностей:

$$\mu = \mu_{\text{эф}} + \mu_{\text{эо}} \quad (52)$$

Это дает определенные преимущества при анализе смесей противоположно заряженных ионов, поскольку все определяемые компоненты будут двигаться в направлении детектора вследствие ЭОП. Однако скорость передвижения ионов с одинаковым направлением электрофоретической и электроосмотической подвижностей будет увеличиваться, а противоположенным – уменьшаться. Для немодифицированного кварцевого капилляра в диффузной части двойного электрического слоя присутствует некоторая избыточная концентрация катионов, в результате движения которых возникает ЭОП, направленный к катоду. В результате катионы будут перемещаться быстрее и детектироваться до ЭОП, а анионы медленнее

и детектироваться после ЭОП, нейтральные молекулы движутся с ЭОП, как это показано на рисунке 24.

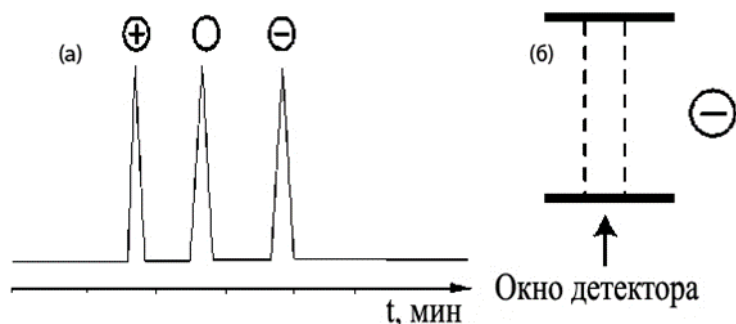


Рисунок 24. Движение заряженных частиц в немодифицированном кварцевом капилляре (а) и общий вид электрофореграммы смеси частиц с различными зарядами (б)

Для повышения воспроизводимости КЭ в присутствии ЭОП, электроосмотический поток должен быть постоянным в течение всех проводимых определений, а сохранение постоянства ЭОП часто требует значительных усилий по подготовке до и после работы. В кварцевых капиллярах ЭОП уменьшается при увеличении концентрации электролита и добавлении органических растворителей и возрастает с увеличением рН, а также зависит от вязкости раствора в капилляре и температуры. Если же при добавлении катионных поверхностно-активных веществ (ПАВ) к разделительному буферу на поверхности капилляра адсорбируется положительный заряд (рисунок 25), то ЭОП меняет направление и переносит разделительный буфер в направлении анода.

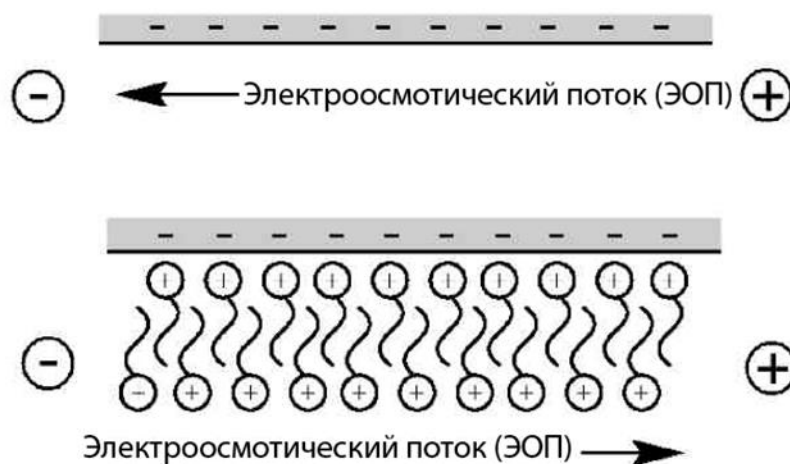


Рисунок 25. Изменение направления электроосмотического потока при модификации кварцевого капилляра катионными поверхностно-активными веществами

Уникальной особенностью ЭОП является плоский профиль потока в капилляре. Такой профиль выгоден, поскольку уменьшается размывание зон разделяемых веществ. Следует отметить, что эффективность разделения в капиллярном электрофорезе прямо пропорциональна, а время

анализа – обратно пропорционально напряжению, приложенному к электродам.

Разделение в КЭ может быть выполнено как с положительной, так и отрицательной полярностью электродов. Зная значения pK_a для компонентов пробы, можно выбрать буфер с подходящим значением pH и полярность электродов, чтобы образец двигался в сторону детектора. Скорость миграции зависит от напряженности электрического поля, которая обычно составляет 200-400 В/см.

Варианты капиллярного электрофореза

Существует ряд вариантов капиллярного электрофореза, отличающихся по принципам и механизму разделения.

Капиллярный зонный электрофорез (КЗЭ) является наиболее распространенным вариантом КЭ и предполагает использование одного буфера в качестве разделяющей среды. Разделение компонентов пробы основа-

но на различиях в подвижности заряженных молекул или ионов. Метод находит широкое применение при определении пептидов, белков, аминокислот, лекарственных препаратов, неорганических ионов и многих других объектов.

Капиллярный ионный анализ – это разновидность КЗЭ в которой для определения неорганических ионов, не поглощающих свет в УФ-области спектра, используется косвенное фотометрическое детектирование, достигаемое за счет введения в буфер для электрофореза коионов, поглощающих свет в УФ-области спектра. Вытеснение коионов в зоне определяемого иона уменьшает фоновое поглощение буфера, что выражается в появлении отрицательного пика на электрофореграмме. Так, при разделении катионов используют различные органические основания, например, бензиламин. При определении неорганических анионов в буфер обычно добавляют катионное поверхностно-активное вещество, которое модифицирует поверхность капилляра и изменяет направление ЭОП. Поскольку направление электрофоретического потока и эндоосмотического потока совпадают, то в этом случае возможны экспрессные и высокоэффективные разделения.

Капиллярная электрокинетическая хроматография основана на разделении нейтральных частиц при их распределении между движущимися в электрическом поле частицами и заполняющим капилляр электролитом. Такое распределение может быть обусловлено действием молекулярных сил, ион-парными взаимодействиями комплексообразованием (лигандный обмен), биоспецифическими взаимодействиями. Имеются следующие разновидности капиллярной электрокинетической хроматографии: мицеллярная, ионообменная, лигандообменная и др.

В мицеллярной капиллярной электрокинетической хроматографии (МКЭКХ) в буферный раствор вводят ПАВ, например, додецилсульфат натрия, что приводит к образованию мицелл, которые будут двигаться к аноду, ЭОП – по направлению к катоду. Разделение основано на различной

степени связывания компонентов смеси с мицеллами. Этот метод широко используется для различных классов как нейтральных, так и заряженных соединений, например, фенолов, ароматических аминов и др.

Капилляры для разделения

подавляющее большинство разделений в КЭ проводят с использованием кварцевых капилляров имеющих внешнее полимерное покрытие, обычно - полиимидное, улучшающее их механическую прочность, и значительно реже полимерные капилляры, например из тефлона. Внутренний диаметр капилляров колеблется в пределах от 25 до 200 микрон, а длина капилляра в зависимости от поставленной задачи - от нескольких сантиметров до 1 метра. Поскольку внешнее полиимидное покрытие непрозрачно в УФ-области, то участок покрытия удаляют и создают окно для УФ-детектирования. Капилляр закрепляется в специальной пластиковой кассете. Надежное термостатирование капилляра является основным условием получения воспроизводимых времен миграции определяемого соединения и площади результирующего пика, что важно для количественного анализа.

Выбор оптимальных размеров капилляра представляет собой компромиссное решение между требуемой чувствительностью определения и разрешающей способностью. Используют капилляры с внутренним диаметром 25-50 мкм, что является компромиссным решением между достаточно высокой чувствительностью и эффективностью разделения.

Модифицированные капилляры. Первоначально большинство разделений в капиллярном электрофорезе проводили с использованием немодифицированных кварцевых капилляров. Однако, необратимость адсорбции белков, пептидов, фрагментов ДНК, а также электростатические взаимодействия разделяемых соединений с внутренней поверхностью капилляров приводят к значительному снижению эффективности и разрешающей способности, невоспроизводимости разделений. Это требует дополнитель-

ных усилий по регенерации капилляров или даже их замене. Главная цель модифицирования внутренней поверхности кварцевого капилляра состоит в изменении величины и направления ЭОП для улучшения эффективности разделения, а также снижения адсорбции. При этом также достигается ускорение или замедление электросепарационных разделений в зависимости от напряженности и полярности электрического поля; разрешающей способности и чувствительности анализа; движение как анионов, так и катионов в одном направлении, что позволяет проводить их одновременное определение.

Введение проб

Проба может быть введена в капилляр электрофоретическим, электрокинетическим или вытеснительным способом. Объем вводимой пробы не превышает 2 нл, относительное стандартное отклонение составляет 0,03-0,04.

При электрофоретическом вводе пробы, к концам капилляра прикладывается высокое напряжение на фиксированный промежуток времени, при этом входной конец капилляра погружают в раствор пробы. Ионы пробы перемещаются в капилляр пропорционально их электрофоретической подвижности. В случае электрокинетического ввода, компоненты пробы попадают в капилляр за счет комбинации электроэндоосмотического давления и электрофоретической подвижности. Вытеснительный ввод пробы достигается либо за счет создания избыточного внешнего давления инертного газа, приложенного к резервуару с образцом, либо за счет создания вакуума на выходе из капилляра или путем изменения уровня/высоты резервуара, содержащего образец, относительно резервуара с буферным раствором на выходе из капилляра (так называемое гравитационное введение пробы).

Детектирование

Хотя применимость различных вариантов детектирования, включая флуоресцентное, электрохимическое и кондуктометрическое, была показана для КЭ (таблица 5), большинство промышленно выпускаемых приборов оснащено фотометрическими детекторами.

Таблица 5. Способы детектирования в капиллярном электрофорезе

Детектор	Определяемые соединения	Предел обнаружения, моль/дм ³	Особенности
Фотометрический: прямое детектирование	Ароматические соединения, белки, нуклеиновые кислоты	$10^{-7} - 10^{-4}$	Наиболее широко используется в УФ-области
Фотометрический: косвенное детектирование	Ионы металлов, амины, органические и неорганические анионы, сахара	$10^{-8} - 10^{-4}$	Определение веществ, не поглощающих в УФ-области
Флуоресцентный: прямое детектирование	Произвольные аминокислот, пептиды, белки	$10^{-9} - 10^{-4}$	Необходимость получения производных
Флуоресцентный: косвенное детектирование	Спирты, амины, сахара, неорганические	$10^{-7} - 10^{-5}$	Применимость к ограниченному кругу веществ

	анионы и катионы		
Лазерный флуоресцентный	Производные аминокислот, фрагменты ДНК	$10^{-13} - 10^{-7}$	Используется редко, очень дорог в использовании
Амперометрический	Биогенные амины, фенольные соединения	$10^{-8} - 10^{-6}$	Пригоден для капилляров с внутренним диаметром до 2 мкм
Кондуктометрический	Ионы металлов, амины, карбоновые кислоты	$10^{-7} - 10^{-5}$	Трудность замены капилляра
Потенциометрический	Ионы щелочных и щелочноземельных металлов	10^{-8}	Трудность получения ионселективных микроэлектродов
Масс-спектрометрический	Белки, пептиды, мониторинг лекарств	$10^{-10} - 10^{-8}$	Широкие возможности, высокая стоимость

КЭ имеет ряд преимуществ по сравнению с ВЭЖХ:

- высокая эффективность разделения, обусловленная плоским профилем электроосмотического потока;
- экономичность, т.к. практически не требуется применение дорогостоящих высокочистых растворителей (ацетонитрил, метанол, гексан) и малый расход реактивов;
- отсутствие дорогостоящих хроматографических колонок;
- отсутствие дорогостоящих прецизионных насосов высокого

давления, необходимых для ВЭЖХ;

– простота аппаратного оформления;

– экспрессность анализа.

Эти преимущества обуславливают широкое использование КЭ для **анализа объектов окружающей среды**. Наиболее часто КЭ используют для определения катионов и анионов в водах. Следует отметить, что разделение одной и той же смеси анионов КЭ занимает существенно меньшее время, чем ВЭЖХ. Электрофореграммы смеси анионов и определения анионов в водопроводной воде показаны на рисунке 26.

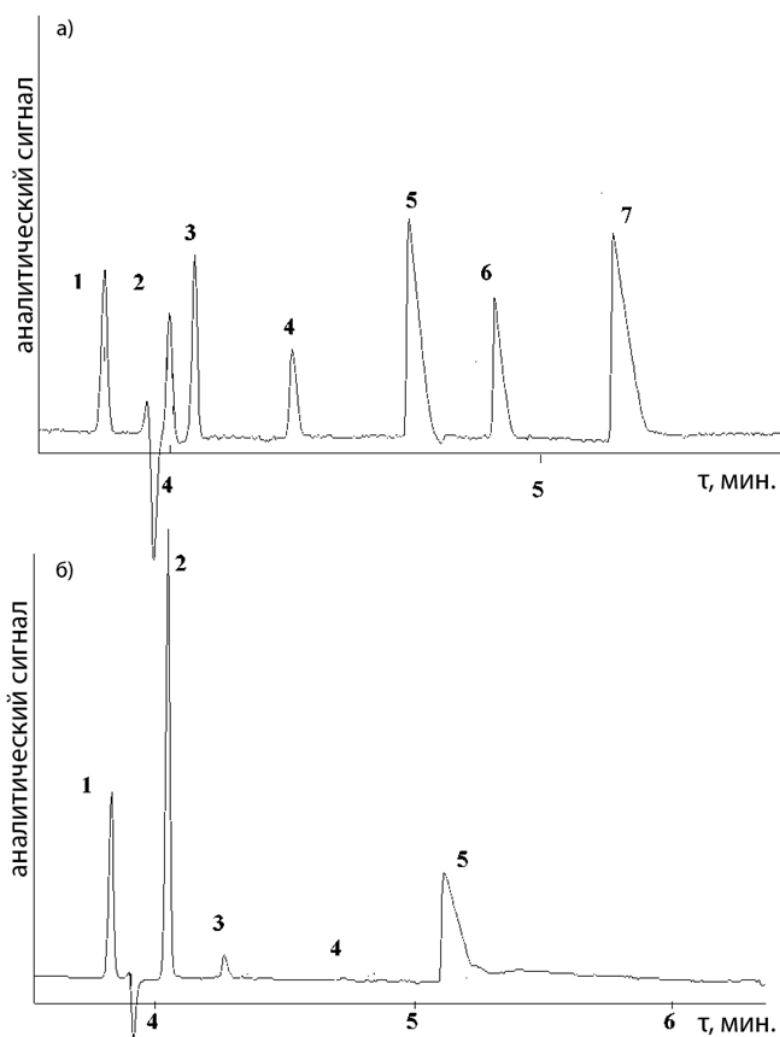


Рисунок 26. Определение анионов в воде капиллярным электрофорезом. а) Электрофореграмма градуировочного раствора. Концентрация каждого аниона (кроме гидрокарбоната) – 2 мг/дм³ : 1 – хлорид; 2 – нит-

рит; 3 – сульфат; 4 – нитрат; 5 – фторид; 6 – гидрофосфат; 7 – гидрокарбонат;

б) Электрофореграмма водопроводной воды: 1 – хлорид ($4,9 \text{ мг/дм}^3$); 2 – сульфат ($18,1 \text{ мг/дм}^3$); 3 – нитрат ($1,4 \text{ мг/дм}^3$); 4 – фторид ($<0,25 \text{ мг/дм}^3$); 5 – гидрокарбонат. Рабочее напряжение $U = -17 \text{ кВ}$

Эффективно применение этого метода и для определения пестицидов и гербицидов в воде и почве. Примеры разделения приведен на рисунке 27.

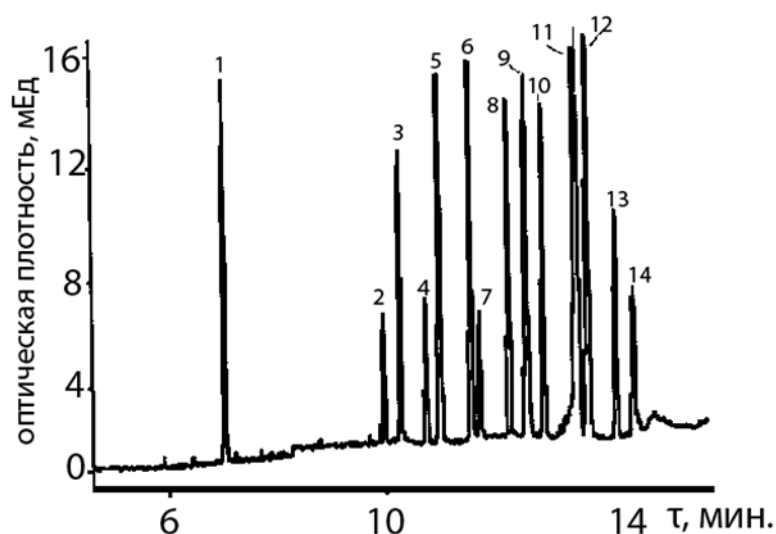


Рисунок 27. Электрофореграмма смеси пестицидов: 1 – десэтилаторазин; 2 – гексазинон; 3 – метоксурон; 4 – монолинуран; 5 – симазин; 6 – цианазин; 7 – метабромурон; 8 – хлортолурон; 9 – изопротурон и атразин; 10 – диурон; 11 – линурон; 12 – метабензтиазурон; 13 – себутилазин; 14 – тетбутилазин; 15 – металахлор. Условия проведения анализа: капилляр длиной 64,5 см и внутренним диаметром 50 мкм; буферный электролит (12 мМ фосфата, 8 мМ бората, рН 8,9, 100 мМ додецилсульфата натрия); напряженность поля 440 В/см; детектор УФ, 214 нм

Метод применим для определения таких опасных экотоксикантов, как фенолы. Электрофоретическое определение фенолов (хлор-, нитро-, метилфенолов) обычно производят методами МКЭКХ или КЗЭ с обращенным электроосмотическим потоком. Селективность разделения повышают,

изменяя рН буфера (область изменения рН 7-10), вводя добавки нейтральных и анионных ПАВ, а также катионных ПАВ совместно с органическими растворителями. В качестве анионной добавки чаще всего используют додецилсульфат натрия, катионной – бромид цетилтриметиламмония, полиэтиленмин, 3,6-ионен. Детектирование фенолов обычно проводят фотометрически на длине волны 190,214 и 280 нм. Предел детектирования с предварительным сорбционным концентрированием составляет 0,3-1 мкг/л. По сравнению с ВЭЖХ повышается эффективность разделения фенолов. Кроме того, гуминовые и фульвокислоты, всегда присутствующие в природных водах, не мешают определению, они отделяются от фенолов с высоким разрешением вследствие различного миграционного поведения.

Помимо экологического контроля капиллярный электрофорез также используется:

в пищевой промышленности: для определения катионов, анионов в минеральной воде и водке; консервантов, катионов, анионов, витаминов, антиоксидантов, красителей в напитках и соках; витаминов, аминокислот, микотоксинов в различных продуктах;

в фармакологии: для анализа лекарственных препаратов, для технологического контроля; разделения энантиомеров;

в биохимии и медицине: для определения белков и аминокислот в биожидкостях гликозилированного гемоглобина и исследования фармакокинетики;

в криминалистике: для выявления следов взрывчатых веществ и наркотических

Плоскостная 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 БХ в качестве носителя неподвижной фазы, например воды, используют целлюлозное волокно бумаги, в методе ТСХ — различные сорбенты (оксид алюминия, силикагель, целлюлозу и др.), нанесенные на пластинку тонким слоем.

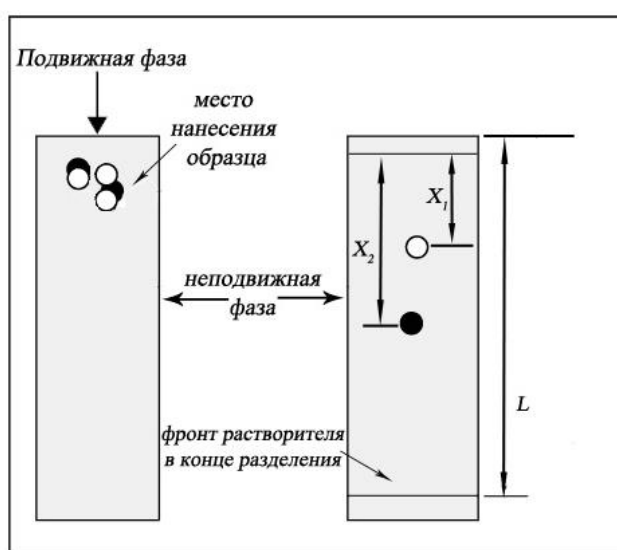


Рисунок 28 Схема ТОНКОСЛОЙНОЙ (бумажной) хроматографии

В обоих методах используют хроматографические системы жидкость-твердый сорбент и жидкость-жидкость-твердый сорбент, причем в качестве подвижной фазы используют различные растворители или их смеси, органические и 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.

Разделяемые компоненты на пластинке или на полоске бумаги образуют отдельные зоны (пятна), положение которых на хроматограмме характеризуется величинами R_f — относительной скоростью перемещения

компонентов в тонком слое или по бумажной полоске. Экспериментально величину R_f определяют как отношение расстояния x , пройденного веществом, к расстоянию L , пройденному растворителем от старта до линии фронта: $R_f = \frac{x_1}{L}$. В соответствии с определением R_f всегда $< 1,00$. Величина R_f зависит от природы носителя (бумага, активность и природа сорбента, толщина слоя сорбента), качества и природы растворителя, способа нанесения пробы, детектирования, т. е. от техники эксперимента, температуры и некоторых других факторов. В идеальном случае (линейная изотерма) R_f не зависит от концентрации определяемого вещества и присутствия других компонентов. Воспроизводимость значений R_f в ТСХ значительно лучше, чем в БХ, и составляет $\pm 0,05 R_f$. Величину x , формально отождествляют с V_R или t_R , характеризующими скорость движения вещества вдоль колонки, а длину зоны (пятна) — с шириной хроматографической полосы у основания w . Основное уравнение колоночной хроматографии $V_R = V_m + DV_S$ применимо, очевидно, и в случае ТСХ.

Величина R_f , характеризующая положение зоны вещества на хроматограмме, связана с коэффициентом распределения в данной системе следующим уравнением:

$$D = \frac{V_m}{V_S} \frac{1}{R_f - 1} \quad (53)$$

Качественный анализ.

Если на хроматограмме образуются окрашенные зоны, то проводят визуальные наблюдения. Невидимые хроматограммы проявляют соответствующими реагентами, как правило, групповыми. По характерной окраске образующихся цветных зон судят о составе анализируемой пробы.

Для обнаружения аминокислот и пептидов применяют нингидрин. Сухую хроматограмму погружают в раствор нингидрина в ацетоне, обычно 0,2%-ный (при этом достигается однородное покрытие бумаги реаген-

том), сушат непродолжительное время. При комнатной температуре пятна аминокислот проявляются примерно через 1 ч, а их окраска достигает максимальной интенсивности примерно за 8 ч. Пятна пептидов обнаруживаются медленнее. Проявление ускоряется, если хроматограмму нагревают при 50—60 °С в сушильном шкафу.

Для обнаружения компонентов используют также метод, основанный на измерении величин R_f для стандартного и обнаруживаемого веществ в определенном растворителе. Идентификация компонентов этим способом может быть осуществлена, если проводить хроматографирование и определение R_f для стандартного и исследуемого растворов в одной камере, на одинаковых полосках бумаги или на одной и той же пластинке. После проявления обеих хроматограмм определяют R_f исследуемого и стандартного растворов. Сопоставляя их, делают заключение о наличии в исследуемом растворе тех или иных компонентов.

Количественный анализ осуществляют непосредственно на хроматограмме (на слое сорбента или на бумаге) или анализируемое вещество (пятно) вымывают из слоя сорбента (с бумажной полоски) после вырезания зоны, и полученный раствор анализируют каким-либо методом.

Непосредственно на хроматограммах количественный анализ можно осуществлять по размеру пятна (полуколичественное определение), спектрофотометрическим методом по спектрам поглощения фотоденситометрия) и по спектрам отражения, а также флуориметрическим, рентгенофлуоресцентным и радиометрическим методами. Определение компонентов после смывания можно выполнить, например, спектрофотометрическим, флуориметрическим, атомно-абсорбционным методами. Предел обнаружения дается в виде абсолютного количества в слое, реже в виде количества, приходящегося на 1 г сорбента, но лучше всего в виде концентрации в анализируемой пробе. Относительные стандартные отклонения при ис-

пользовании спектрофотометрических методов анализа не превышают 1 %.

Гель-хроматография

Это совершенно своеобразный вид хроматографии, основанный на использовании различия в размерах молекул. Его называют также *гель-фильтрацией* или *ситовой хроматографией*. Неподвижной фазой в гель-хроматографии является растворитель, находящийся в порах геля, а подвижной — сам растворитель, т. е. и подвижную и неподвижную фазы составляет одно и то же вещество или одна и та же смесь веществ. Гель готовят на основе, например, декстрана, полиакриламида или других природных и синтетических соединений.

В процессе гель-хроматографирования могут быть отделены крупные молекулы, которые гелем не сорбируются, так как их размеры превышают размеры пор, от мелких, которые проникают в поры, а затем могут быть элюированы. Проводятся и более тонкие разделения, так как размеры пор можно регулировать изменяя, например, состав растворителя и, как следствие, набухаемость геля. Гель-хроматография может быть выполнена в колоночном варианте и в тонкослойном.

Применяемые на практике гели обычно подразделяют на *мягкие*, *полужесткие* и *жесткие*. Мягкими гелями являются высокомолекулярные органические соединения с незначительным числом поперечных связей. Фактор емкости, равный отношению объема растворителя внутри геля к его объему вне геля, у них равен 3. При набухании они значительно увеличивают собственный объем. Это сефадексы или декстрановые гели, агарочные гели, крахмал и др. Они применяются для разделения смесей низкомолекулярных веществ, часто в тонкослойном варианте. Хроматографирование на мягких гелях называют *гель-фильтрацией*.

Полужесткие гели получают путем полимеризации. Большое распространение получили *стирогели* — продукты сополимеризации стирола и

дивинилбензола с большим числом поперечных связей. Фактор емкости полужестких гелей лежит в пределах 0,8—1,2, их объем при набухании увеличивается не очень значительно (в 1,2—1,8 раза). Хроматографирование на полужестких гелях называют *гель-проникающей хроматографией*.

К жестким гелям относят силикагели и часто пористые стекла, хотя они и не являются гелями. Жесткие гели имеют небольшой фактор емкости (0,8—1,1) и фиксированный размер пор. Эти материалы используют в гель-хроматографии при высоком давлении. Растворители гель-хроматографии должны растворять все компоненты смеси, смачивать поверхность геля и не адсорбироваться на ней. Практическое применение гель-хроматографии связано, главным образом, с разделением смеси высокомолекулярных соединений, хотя нередко они используются для разделения и низкомолекулярных, так как разделение этим методом возможно при комнатной температуре

Глава 2. Лабораторный практикум

Лабораторная работа №1. Определение полной динамической обменной емкости (ПДОЕ) ионитов

Введение

Матрица синтетических полимерных материалов (типа полистирола) является гидрофобной и не проявляет способности к набуханию в полярных растворителях. Однако после введения в нее ионогенных групп, обладающих резко выраженной гидрофильностью, приведение гранул ионообменника в контакт с водой или раствором вызывает заметное поглощение растворителя фазой ионита. Количество поглощенного растворителя (величина набухаемости) имеет определенный предел, определяемый жесткостью полимерного каркаса матрицы, т.е. наличием поперечных связей (сшивки) в полимерной молекуле. Поскольку иониты применяются в большинстве случаев для обработки водных растворов, рассмотрим главный частный случай их сольватации – гидратацию.

Общую массу поглощенной ионитом воды нельзя считать однородной, поскольку часть ее не принимает участия в процессах разбавления и транспорта ионов. На этом основано условное разделение сорбированной воды на «связанную» и «свободную».

К «связанной» воде относится гидратная вода первичных гидратных оболочек фиксированных ионов и противоионов. При набухании абсолютно сухого ионита эта вода поглощается в первую очередь с большим тепловым эффектом. Этот процесс первичной гидратации приводит к образованию очень концентрированного раствора полиэлектролита (до 5 моль/дм³ и выше), осмотическое давление которого выше, чем внешнего раствора. «Связанная» вода не участвует в разбавлении сверхэквивалентно сорбированного электролита и отличается от обычной воды рядом свойств: меньшим парциальным объемом, пониженной температурой замерзания и

др. Количество «связанной» воды определяется числами гидратации ионов, оно пропорционально количеству функциональных групп, непосредственно связано с природой фиксированного иона и слабо зависит от степени сшитости ионита.

Возникшая при первичной гидратации разность осмотических давлений внутреннего и внешнего растворов приводит к дополнительному поглощению ионитом так называемой «свободной» воды. Этот процесс вторичной гидратации происходит до установления осмотического равновесия между внутренним и внешним растворами.

«Свободную» воду часто разделяют на «порозную» и «равновесную». Первая соответствует растворителю, находящемуся в микропорах и микротрещинах гранул (в случае макропористых ионитов основная часть «порозной» воды содержится в макропорах).

Таким образом, растворителем для гидратированных противоионов является «равновесная» вода, обладающая свойствами, промежуточными между «порозной» и «связанной». Количество «равновесной» воды определяется условиями равновесия между упругостью матрицы и осмотическим давлением и зависит от вида полимера, степени его сшитости и от активности внешнего и внутреннего растворов электролита. Осмотической активностью в фазе ионита обладают только противоионы, так как влияние фиксированных ионов на воду незначительно, следовательно, количество равновесной воды должно зависеть от степени диссоциации функциональных групп, которая определяется видом противоиона.

Обычно применяемые в практике ионного обмена промышленные образцы ионитов увеличивают свой объем при набухании в 1,5-3 раза. При нормальных условиях в ионообменнике, находящемся в воздушно-сухом состоянии, содержится некоторое количество влаги (около 20%). Следовательно, перед исследованием содержания сольватирующего растворителя в ионите или кинетических экспериментов по изучению скорости набухания,

образцы ионитов должны быть соответствующим образом подготовлены. Подготовка ионитов к работе состоит в их кондиционировании и высушивании. Кондиционирование ионообменников проводится по стандартным методикам попеременной обработкой их растворами электролитов в различных ионообменных циклах. При этом происходит отмывка исходного образца от различных примесей и стабилизация структуры пространственной сетки матрицы. Высушивание ионитов проводится с целью получения абсолютно сухих полимеров, а также для количественного определения содержания в них твердого вещества или остаточного сольватирующего растворителя.

Процесс сушки ионитов контролируется, как правило, их периодическим взвешиванием. При достижении высушенным ионитом постоянного веса по разности с массой исходного образца находят исходное влагосодержание ионообменника, выражая его в виде одной из общепринятых характеристик.

В случае нетермостойких ионитов вместо сушки, сопряженной с опасностью термической деструкции матрицы, можно рекомендовать определение остаточной влажности воздушно-сухих образцов титрованием их реактивом Фишера, или экстракционным методом. Последний метод в силу его простоты и экспрессивности заслуживает более детального рассмотрения.

Суть метода состоит в извлечении воды из навески ионита диметилформамидом (ДМФА) с последующим определением состава экстракта по показателю преломления. Для этого точную навеску исследуемого ионита (около 2 г) помещают в бюкс или в колбу с притертой пробкой, заливают 15 мл ДМФА (объем отмеряется пипеткой или бюреткой), закрывают пробкой и перемешивают в течение 15 минут. Затем измеряют показатель преломления жидкости на рефрактометре при 20⁰С. Если для экстракции был использован чистый ДМФА, то его содержание в экстракте (X

ДМФА) находят по калибровочному графику, построенному на основании данных таблицы 1.1. Общее время анализа не превышает 20-30 минут.

Таблица 1.1.

Показатели преломления смесей ДМФА-вода при 20°C.

X _{ДМФА} , % (мас)	n_D^{20}	X _{ДМФА} , % (мас)	n_D^{20}	X _{ДМФА} , % (мас)	n_D^{20}
50	1,3890	76	1,4160	90	1,4260
55	1,3945	78	1,4180	92	1,4270
60	1,4000	80	1,4205	94	1,4280
65	1,4060	82	1,4215	96	1,4290
70	1,4120	84	1,4225	98	1,4310
73	1,4135	86	1,4240	99	1,4320
75	1,4155	88	1,4250	100	1,4330

По найденному содержанию ДМФА в экстракте рассчитывают влажность ионита ω_{H_2O} (%) по соотношению:

$$\omega_{H_2O} = \frac{(100/x - 1) \rho_{ДМФА} \cdot V \cdot 100}{m_{нав}}, \quad (1.1)$$

где V- исходный объем ДМФА см³,

$\rho_{ДМФА}$ – плотность экстрагента, равная для чистого вещества 0,945 г/см³;

$m_{нав}$ - навеска ионита;

x – массовая доля ДМФА в экстракте, %;

В случае использования для экстракции влажного ДМФА необходимо знание его плотности $\rho_{ДМФА}$ и исходного влагосодержания $(1-x_1)$, определяемого по показателю преломления (см. табл.1.1). Если содержание ДМФА в экстракте составит величину x_2 , то влажность ионита рассчитывается по формуле:

$$\omega_{H_2O} = \frac{(\frac{x_1}{x_2} - 1) \rho'_{ДМФА} \cdot 100}{m_{нав}}, \quad (1.2)$$

где x_1 и x_2 - массовая доля ДМФА до и после извлечения воды из ионита, %;

1.1. Цель работы:

Получение динамических характеристик поглотительной способности ионита.

1.2. Объекты и средства исследования.

1. Хроматографическая колонка диаметром 1 см и высотой 25 см
2. Катионит КУ-2
3. Аналитические весы
4. Сушильный шкаф
5. Хлороводородная кислота, водный раствор $C(1/1 \text{ HCl}) = 0,1$ моль/дм³; $C(1/1 \text{ HCl}) = 1$ моль/дм³
6. Гидроксид натрия, водный раствор, $C(1/1 \text{ NaOH}) = 0,1$ моль/дм³; $C(1/1 \text{ NaOH}) = 1$ моль/дм³
7. Хлорид натрия, водный раствор, $C(1/1 \text{ NaCl}) = 0,1$ моль/дм³
8. Бюретки вместимостью 25 см³, 2 шт
9. Мерные цилиндры вместимостью 10 см³, 2 шт
10. Мерные колбы вместимостью 250 см³, 2 шт
11. Пипетки вместимостью 25 см³, 2 шт
12. Химические стаканы вместимостью 50 см³, 2 шт
13. Колбы для титрования вместимостью 250 см³, 2 шт
14. Индикаторы – универсальный, метиловый оранжевый, фенолфталеин.

1.3. Программа работы.

1.3.1. Подготовка ионита

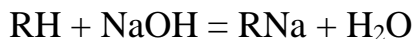
Навеску воздушно-сухого катионита КУ-2 или ионита АВ-17 (около 5 г), взятую на аналитических весах с точностью до 0,0002 г, помещают в химический стакан и заливают дистиллированной водой. По истечении 30 минут набухший ионит переносят вместе с водой в хроматографическую колонку, слой ионита в колонке не должен содержать пузырьков воздуха, если пузырьки появились, то их необходимо удалить встряхиванием или взрыхлением ионита снизу вверх током воды.

Ионит в колонке переводят в Н-форму (катионит) или в ОН-форму (анионит) пропусканием через колонку в течение 30 минут 100 см³ раствора $C(^{1/1}\text{HCl}) = 1$ моль/дм³ или $C(^{1/1}\text{NaOH}) = 1$ моль/дм³ соответственно. После этого ионит тщательно отмывают дистиллированной водой от избытка кислоты или щелочи (до нейтральной среды по универсальному индикатору).

1.3.2. Определение ПДОЕ катионита.

Проводят стандартизацию NaOH по первичному стандарту HCl, приготовленному из фиксонала с индикатором метиловым оранжевым.

Через слой катионита в Н-форме пропускают 100 см³ раствора NaOH ($C(^{1/1}\text{NaOH}) = 0,1$ моль/дм³ в течение 1 часа. Скорость пропускания раствора не более 2 см³ в минуту. При проведении эксперимента необходимо следить, чтобы уровень раствора в хроматографической колонке поддерживался постоянным. При этом протекает реакция:



Катионит промывают дистиллированной водой до тех пор, пока вытекающий из колонки раствор не станет нейтральным (контроль по универсальной индикаторной бумаге).

Фильтрат и промывные воды собирают в мерную колбу на 250 см³ доводят до метки дистиллированной водой и определяют остаточное количество щелочи. Для этого аликвотную часть раствора (25 см³) титруют

раствором HCl с индикатором метиловым оранжевым до перехода окраски из желтой в оранжевую.

Величину полной динамической емкости катионита (ПДОЕ) вычисляют по формуле:

$$ПДОЕ = \frac{[C(1/1NaOH) \cdot V_{NaOH} - C(1/1HCl) \cdot V_{cp} \cdot 10]}{m_{нав}}, \quad (1.3)$$

где ПДОЕ – полная динамическая обменная емкость

$C(1/1NaOH)$ – концентрация щелочи, рассчитанная при стандартизации, моль/дм³

$C(1/1HCl)$ – концентрация кислоты, моль/дм³

V_{NaOH} – объем щелочи, 100см³

V_{cp} – средний объем кислоты, пошедший на титрование, см³

$m_{нав}$ – навеска ионита, г

1.3.3. Определение ПДОЕ анионита

Через слой анионита в OH-форме пропускают 200 см³ раствора HCl в течение двух часов, следя за уровнем раствора над анионитом. При этом протекает реакция: $RON + HCl = RCl + H_2O$.

Анионит промывают раствором NaCl для удаления слабоосновных групп анионита. Промывание проводят до нейтральной реакции фильтрата (контроль по универсальной индикаторной бумаге).

Фильтрат и промывную жидкость собирают в мерную колбу на 250 см³ и определяют остаточное количество HCl. Для этого аликвотную часть раствора (25 см³) титруют раствором NaOH с индикатором фенолфталеином до возникновения бледно-розовой окраски.

Величину полной динамической емкости анионита (ПДОЕ) вычисляют по формуле:

$$ПДОЕ = \frac{[C(1/1HCl) \cdot V_{HCl} - C(1/1NaOH) \cdot V_{cp} \cdot 10]}{m_{нав}}$$

где $C(^{1/1}\text{HCl})$ - концентрация кислоты, рассчитанная при стандартизации, моль/дм³

$C(^{1/1}\text{NaOH})$ – концентрация щелочи, моль/дм³

V_{HCl} – объем кислоты, 200 см³

$V_{\text{ср}}$ – средний объем щелочи, пошедший на титрование, см³

$m_{\text{нав}}$ – навеска ионита, г

Лабораторная работа №2. Равновесие ионного обмена

Введение

Равновесие гетерогенной реакции обмена ионов $B^{Z_{B^+}} - A^{Z_{A^+}}$ на катионите

$$\frac{1}{Z_A} AR_{Z_A} + \frac{1}{Z_B} B^{Z_{B^+}} = \frac{1}{Z_A} A^{Z_{A^+}} + \frac{1}{Z_B} BR_{Z_B} \quad (2.1)$$

характеризуется термодинамической константой равновесия, которую можно записать в следующем виде:

$$K = \frac{\bar{a}_B^{1/Z_B} \cdot a_A^{1/Z_A}}{\bar{a}_A^{1/Z_A} \cdot a_B^{1/Z_B}} \quad (2.2),$$

где \bar{a} и a – активности ионов в фазе ионита и в растворе соответственно.

Ввиду сложности определения активностей в ионите практически используют «кажущуюся»:

$$\tilde{K} = \frac{m_B^{1/Z_B} \cdot a_A^{1/Z_A}}{m_A^{1/Z_A} \cdot a_B^{1/Z_B}} \quad (2.3)$$

и «концентрационную»

$$\tilde{K} = \frac{m_B^{1/Z_B} \cdot c_A^{1/Z_A}}{m_A^{1/Z_A} \cdot c_B^{1/Z_B}} \quad (2.4)$$

константы ионообменного равновесия, где m и c – концентрации обменивающихся ионов в фазах ионита и раствора соответственно.

Вследствие неидеальности фаз величина \tilde{K} не является постоянной, а изменяется в зависимости от отношения концентраций обменивающихся ионов и суммарной концентрации раствора. В ряде случаев эти изменения невелики, и ими можно пренебречь.

Для характеристики селективности удобно применять величину:

$$K_x = \frac{y_B^{1/Z_B} \cdot x_A^{1/Z_A}}{y_A^{1/Z_A} \cdot x_B^{1/Z_B}} \quad (2.5),$$

где y и x – эквивалентные доли иона в ионите и растворе, соответственно.

При $K_x > 1$ ионит сильнее поглощает ионы В, при $K_x < 1$ – ионы А.

Соотношение между \tilde{K} и K_x можно получить, поделив числитель и знаменатель (2.4) на произведение $m_0 c_0$, где $m_0 = m_A + m_B$, $c_0 = c_A + c_B$.

$$K_x = \tilde{K} \left(\frac{m_0}{c_0} \right)^{1/Z_A - 1/Z_B} \quad (2.6)$$

Из этого соотношения видно, что при обмене ионов разного заряда селективность зависит от концентрации раствора. С увеличением концентрации увеличивается селективность ионита к ионам меньшего заряда.

В теории процессов разделения (в том числе ионообменных) для характеристики равновесия чаще используется равновесный коэффициент разделения или коэффициент однократного разделения:

$$\alpha_A^B = \frac{\frac{y}{1-y}}{\frac{x}{1-x}} \quad (2.7)$$

где y и x – эквивалентные доли иона В в ионите и растворе соответственно.

Для обмена ионов разного заряда даже в случае постоянства \tilde{K} величина α зависит от суммарной концентрации обмениваемых ионов и от отношения их концентраций. Соответствующие соотношения нетрудно получить из (2.5) и (2.7). Например, при $z_B = z$; $z_A = 1$

$$\alpha = \tilde{K}^z \cdot \left(\frac{m_0}{c_0} \right) \cdot \frac{1-y}{1-x} \quad (2.8)$$

При обмене ионов равного заряда ($z_A = z_B = z$)

$$\alpha = \tilde{K}^z \quad (2.9)$$

Отметим, что для определения α достаточно измерить отношение количества обмениваемых ионов в ионите, тогда как при определении \tilde{K} в общем случае необходимо измерять концентрации в фазе ионита, что является более сложной задачей, чем определение количеств.

Для характеристики равновесного распределения используют также графические зависимости концентрации m или чаще доли одного из обмениваемых ионов в ионите y от концентрации c или доли его в растворе x (изотермы обмена) (рисунок 2.1) при постоянной суммарной концентрации раствора.

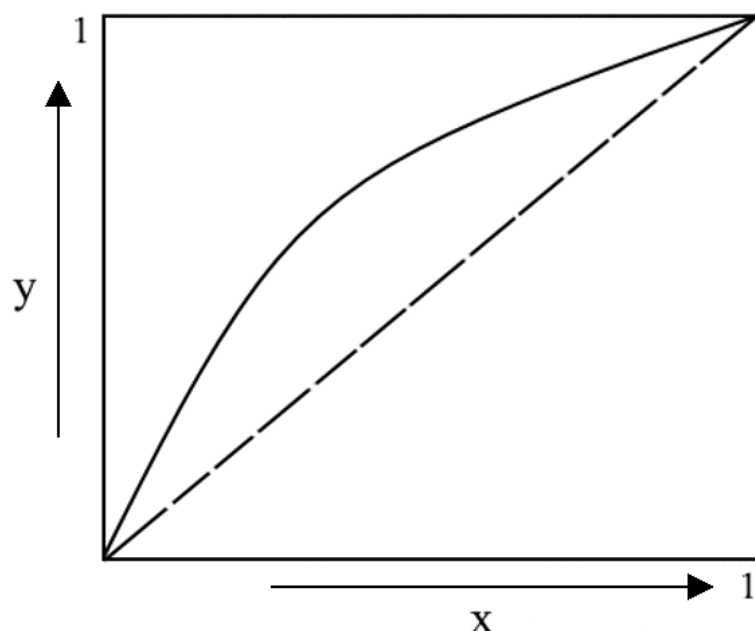


Рисунок 2.1. Изотермы равновесия обмена

Поскольку на практике ионообменные процессы осуществляются в колонках, а обмен, как известно, происходит в эквивалентных количествах, то с точки зрения практического применения ионного обмена равновесие

целесообразно характеризовать зависимостью \tilde{K} или α от ионного состава раствора или ионита или изотермой $y=f(x)$ при постоянной суммарной эквивалентной концентрации.

Выделяют две группы методов изучения равновесия ионного обмена: прямые и косвенные. Первая группа охватывает методы, в которых после приведения ионита в равновесие с раствором производится отделение фаз друг от друга и анализ содержания ионов в фазах, вторая группа включает методы, использующие закономерности динамики ионного обмена для определения величин, характеризующих равновесное распределение ионов.

1. Прямые методы

Статический метод заключается в том, что навески ионита (обычно воздушно-сухого), насыщенного одним или обоими обменивающимися ионами приводят в равновесие с растворами смеси солей тех же ионов путем достаточно продолжительного встряхивания. После достижения равновесия ионит отделяют от раствора и аналитически определяют равновесный состав ионов в растворе и в ионите. Обмениваемые ионы из ионита для этого полностью вытесняют каким-либо третьим ионом. При обмене ионов из растворов не слишком высоких концентраций (обычно не более 0,3 моль/дм³) на сильнокислотных и сильноосновных ионитах удалять электролит из межзернового пространства можно промыванием ионита водой.

В случае значительной сорбции электролита отмывание ионита водой может приводить к ошибкам в определении абсолютных значений концентраций ионов в фазе ионита, а также к ошибкам в определении относительного содержания ионов каждого вида в ионите. Эти ошибки возникают по следующим причинам:

1. Состав сорбированного электролита, вообще говоря, может отличаться от состава той части противоионов, которая связана с фиксированными обменными группами;

2. Вымывание сорбированного электролита из ионита водой может сопровождаться перераспределением ионов между раствором и фазой набухшего ионита.

Промывать водой нельзя также солевые формы легкогидролизуемых слабокислотных и слабоосновных ионитов. В этих случаях раствор удаляют продуванием воздухом, отсасыванием на фильтре или центрифугированием.

Иногда в статическом методе количества сорбированных ионов определяют по балансу, без анализа фазы ионита, зная разность концентраций исходного и равновесного растворов, что является менее точным. Кроме того, точность значительно снижается тем, что происходят трудноучитываемое изменение объема раствора вследствие набухания ионита (особенно в случае слабосшитых сильнонабухающих смол).

Разновидностью статического является так называемый прогрессивно-ступенчатый метод. По этому методу к навеске ионита известной емкости, насыщенного одним из обменивающихся ионов А, добавляют определенный объем раствора с известным содержанием другого обменивающегося иона В. После достижения равновесия отбирают аликвотную часть равновесного раствора, в которой аналитически определяется содержание обменивающихся ионов, а к оставшемуся в контакте с ионитом раствору добавляют новую порцию исходного раствора, содержащего определенное количество ионов В. Повторяя описанную операцию и производя соответствующий расчет, можно получить изотерму обмена. Этот метод требует меньше материалов, чем обычный статический. Однако наряду с недостатками, присущими тому варианту статического метода, в котором производится анализ только фазы раствора, прогрессивно – ступенчатый метод еще менее точен в результате последовательного наложения ошибок в определении равновесного состава фазы ионита по разности между емкостью и содержанием ионов в растворе.

К прямым методам относится также “колоночный”, в котором раствор, содержащий обменивающиеся ионы, пропускают через навеску ионита, помещенного в колонку, до тех пор, пока состав выходящего из колонки раствора не станет равным составу входящего. Это означает, что ионит прошел в равновесие с подаваемым в колонку раствором.

Такой способ приведения в равновесие рекомендуется использовать для сильнокислотных и сильноосновных ионитов. Равновесный ионный состав обменника определяется после отделения раствора (см. выше) и полного вытеснения сорбированных ионов вспомогательным. Расчет α проводится по формуле

$$\alpha = \frac{\bar{q}_B \cdot c_A}{\bar{q}_A \cdot c_B} \quad (2.10)$$

где c_A/c_B – отношение концентрации ионов А и В в исходном растворе, \bar{q}_B/\bar{q}_A – отношение количества ионов А и В (мэкв), вытесненных из ионита.

Как статический, так и колоночный метод позволяют изучать равновесное распределение при любых соотношениях ионов. В статическом методе этого можно достичь, изменяя как соотношение между количествами ионита и раствора, так и относительные количества ионов каждого вида в системе. Однако при малых содержаниях одного из компонентов в системе допустимые изменения составов ограничиваются возможностями аналитического определения концентраций. В колоночном методе путем смешения исходных растворов точной концентрации можно приготовить раствор любого состава достаточно точно даже тогда, когда аналитическое определение бедного компонента в полученном растворе осуществимо с большими ошибками.

2. Косвенные методы

Метод Спединга. В случае близких по свойствам ионов (когда $\alpha < 1,1$ и прямые методы дают большую ошибку) величины α удобно определять по методу Спединга из результатов опыта по фронтальному разделению ионов.

При проведении опыта смесь ионов А и В пропускают через колонку с ионитом, насыщенным вспомогательными ионами D, которые сорбируются слабее, чем исследуемые. Вначале выходящий из колонны раствор содержит вытесняющиеся из ионита вспомогательные ионы D. Перед появлением в фильтрате первых следов ионов А и В фракциями начинают отбирать раствор. Головные фракции выходящей из колонны смеси обогащены слабее сорбируемым компонентом (рисунок 2.2).

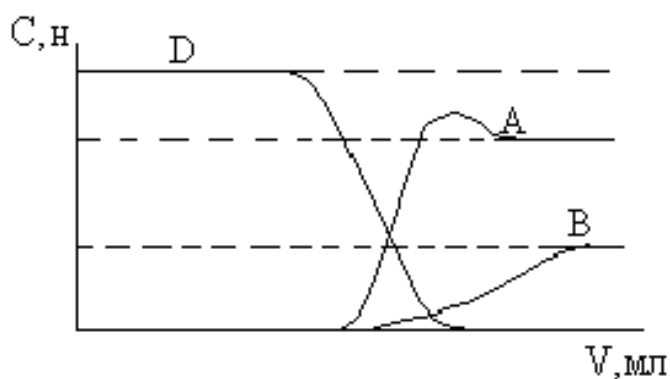


Рисунок 2.2. Вид выходной кривой при фронтальном анализе ионов А и В.

В последующих фракциях обогащение уменьшается, а затем состав выходящего раствора становится равным составу поступающего в колонну раствора. Это означает, что ионит пришел в равновесие с исходным раствором. Поскольку уменьшение доли сильнее сорбирующегося компонента в выходящем из колонны растворе по сравнению с поступающим должно происходить за счет увеличения его содержания в ионите, то по накоплению слабее сорбируемого иона в вышедшем из колонны растворе можно рассчитать α . Расчет проводят по формуле:

$$\frac{\varepsilon}{1 + \varepsilon x_0} = \frac{\sum_{i=1}^f v_i c_i (x_0 - x_i)}{Q \cdot x_0 (1 - x_0)} \quad (2.11)$$

где $\varepsilon = \alpha - 1$, x_0 и x_i - эквивалентные доли сильнее сорбируемого иона.

В исходной смеси и в i - фракции выходящего раствора; v_i - объем i - пробы (мл), c_i - суммарная концентрация ионов А и В в ней (н), f - количество отобранных фракций, Q - сорбционная емкость ионита в колонне (общее количество сорбированных ионов А и В, мэкв.).

В случае сильно набухающих ионитов величина Q может значительно отличаться от полной емкости ионита в колонне вследствие сверхэквивалентной сорбции электролита.

Описанный метод весьма трудоемок и его целесообразно использовать при определении коэффициента разделения очень близких по сорбируемости ионов, например, изотопных, когда более простые методы не могут быть использованы из-за недостаточной точности методов анализа.

2.1. Цель работы:

Определение характеристик равновесия обмена ионов щелочного или щелочно-земельного металла на протоны катионообменной смолы в Н-форме.

2.2. Объекты и средства исследования.

1. Катионообменная смола в Н-форме;
2. Колбы вместимостью 100 см³, 10 шт.;
3. Бюретка для титрования вместимостью 25 см³, 2 шт.;
4. Стеклоанная ионообменная колонка с внутренним диаметром 10-15 мм и высотой 100-120 мм, заполненная сульфокатионитом КУ-2-8;
5. Мерные колбы вместимостью 50, 100, 250, 2000 см³;
6. Пипетки вместимостью 5 и 10 см³;
7. Конические колбы для титрования вместимостью 250 см³;

8. Мерный цилиндр вместимостью 250 см³;
9. Гидроксид натрия, водный раствор, $C(1/1 \text{ NaOH}) = 0,02 \text{ моль/дм}^3$;
 $C(1/1 \text{ NaOH}) = 0,1 \text{ моль/дм}^3$;
10. Хлорид металла, водный раствор, $C(1/1 \text{ MCl}) = 0,1 \text{ моль/дм}^3$;
11. Соляная кислота, водный раствор, $C(1/1 \text{ HCl}) = 1 \text{ моль/дм}^3$;
12. Соли щелочных металлов, водный раствор $C(1/1 \text{ MeX}) = 0,1 \text{ моль/дм}^3$;
13. Индикатор фенолфталеин;
14. Аппарат для встряхивания.

2.2. Программа работы.

2.2.1. Определение константы равновесия обмена ионов щелочно-го или щелочно-земельного металла на протоны катионообменной смолы в Н-форме.

В колбы с навесками смолы 0,5 г добавляют по 50 см³ раствора соли с концентрацией 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1 моль/дм³. Навески берутся с точностью до 0,001 г; растворы – до 0,1 см³. Для установления равновесия колбы встряхивают в аппарате для встряхивания в течение суток. В аликвотной части равновесных растворов определяют концентрации выделившихся ионов водорода титрованием раствором $C(1/1 \text{ NaOH}) = 0,02 \text{ моль/дм}^3$ с индикатором фенолфталеином. Полученные данные и рассчитанные величины записываются в виде таблицы 2.1.

Таблица 2.1.

Результаты определения константы равновесия обмена ионов на Н-форме смолы.

№колб	Кол-во NaOH, пошедшее на титрование 10 см ³ раствора	Выделилось [H ⁺]мэкв.(В)	1/В	Исходное кол-во соли мэкв.(В ₀)	Кол-во соли в равновесном растворе, мэкв (В ₀ -В)	В/ В ₀ – В	Кср.

Полученные результаты обрабатываются с помощью закона действующих масс.

Для реакции:



HR- водородная форма смолы,

MeR – солевая форма смолы (для одновалентных металлов)

Константа равновесия:

$$K = \frac{[B_0] \cdot [B]}{[B_m - B] \cdot [B_0 - B]} \quad (2.13)$$

Если обозначить:

В_м – общее количество обменных группв 0,5 г смолы, мэкв,

В₀- исходное количество соли (мэкв),

В - количество обменявшихся ионов (мэкв), то

$$K = \frac{B^2}{(B_0 - B) \cdot (B_m - B)} \quad (2.14)$$

или $\frac{B_m - B}{B} = \frac{1}{k} \cdot \frac{B}{B_0 - B}$, откуда $\frac{1}{B} = \frac{1}{B_m} + \frac{1}{k \cdot B_m} \cdot \frac{B}{B_0 - B}$

Зная V_0 и определяя величину V , равную количеству выделившихся ионов водорода, можно построить (для одинаковых навесок смолы) кривые зависимости $1/V$ от $V/V_0 - V$. Если реакция ионного обмена подчиняется закону действующих масс и для выбранных в задаче условий можно принять уравнение закона действующих масс с использованием концентраций вместо активностей, то должна получиться линейная зависимость (рисунок 3.3). Величина V находится из графика ($1/V_m$ – относительный участок на оси ординат). Значения “К” рассчитываются из полученных для каждой точки (с найденным графическим V), после чего находится средняя арифметическая величина $K_{ср}$.

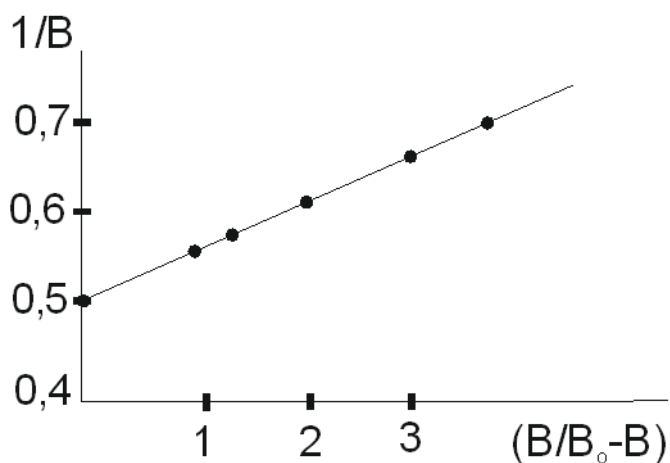


Рисунок 2.3. Зависимость $1/V$ от $V/V_0 - V$ для обменасоли в смоле в H-форме.

2.2.2. Определение коэффициента разделения ионов щелочных металлов колоночным методом.

Через колонку с катионитом, насыщенным ионом A^+ , пропускают раствор $C = 0,1$ моль/дм³, содержащий катионы A^+ и B^+ в отношении, указанном преподавателем. Объем пропускаемого раствора оценивается из тех соображений, чтобы количество мэкв слабее сорбируемого компонента было бы не меньше емкости ионита в колонке. Скорость пропуска раствора 1-2 см³/мин.

После достижения равновесия ионит промывают водой и через колонку пропускают раствор, содержащий ионы D для вытеснения A и B. В случае, когда определяют α для двух ионов щелочных металлов, вытеснение удобно проводить раствором $C(1/1HCl) = 1$ моль/дм³. Если же изучается равновесие обмена иона щелочного металла на ион H^+ , то вытеснять можно раствором хлорида (0,5 моль/дм³) какого-либо другого щелочного металла. Полноту вытеснения ионов A и B проверяют анализом вытекающего раствора с помощью пламенного спектрофотометра. После вытеснения катионов A и B из ионита в полученном растворе определяют отношение концентраций ионов A и B (пламенно-спектрофотометрически или титрованием). Расчет α_B^A проводят по формуле (2.10).

После проведения аналогичного опыта на той же колонне, но только с сульфокатионитом, насыщенном ионом B, также получают α_B^A .

Величина α_B^A должна не зависеть от того, в какой форме находился сульфокатионит перед приведением в равновесие с исходным раствором и поэтому совпадение полученных величин α_B^A подтверждает надежность полученного значения α_B^A .

Другим критерием надежности служит совпадение суммарного количества вытесненных ионов A и B с обменной емкостью ионита. Для определения обменной емкости ионит переводят в H-форму, промывают водой, обрабатывают хлоридом щелочного металла до полного вытеснения H^+ - ионов и оттитровывают кислоту в собранном растворе.

Лабораторная работа №3. Определение нитрата натрия в растворе методом ионного обмена

Введение

Метод ионного обмена используется в аналитической химии для концентрирования ионов из разбавленных растворов, определения общего содержания солей в водных растворах, удаления мешающих ионов.

Метод ионного обмена дает возможность разделять платиновые металлы, способные в одних и тех же условиях образовывать ионы с различными зарядами. В методе ионообменной хроматографии для разделения платиновых металлов используются почти все те различия в свойствах платиновых металлов, благодаря которым удастся разделить эти металлы при помощи химических методов.

Метод ионного обмена представляет большой интерес в тех случаях, когда требуется определить содержание борной кислоты. Дело в том, что борная кислота может быть точно определена в растворе, пропущенном через колонку с катионитом в Н - форме, даже в присутствии многих других кислот. Для этой цели полезен хорошо известный метод, основанный на нейтрализации раствора с последующим добавлением маннита и титрованием образующегося комплекса борной кислоты.

Метод ионного обмена наиболее удобен для анализов в полевых условиях. Промывать колонку дистиллированной водой не обязательно. Вместо этого можно производить определение из аликвотной части вытекающего раствора, причем первая порция вытекающего раствора отбрасывается. При этом необходимо, конечно, чтобы применяемый катионит не обладал адсорбционным сродством к выделяющимся кислотам. В практике анализов воды принято пользоваться колонками большей емкости, чем это необходимо для однократного определения, и производить целую серию анализов без регенерации колонки между отдельными определениями.

Метод ионного обмена применяется для очистки сточных вод предприятий металлургической, химической, коксохимической, машиностроительной и других отраслей промышленности.

Метод ионного обмена находит широкое применение в гальванопластике и анодировании при обработке истощенных или загрязненных растворов в целях их повторного использования, а также для выделения и концентрации ценных веществ из сточных вод травильных и гальванических цехов. Этот метод применяется в промышленном масштабе при травлении стали фосфорной кислотой или при травлении магния уксусной кислотой. Все операции по извлечению кислоты полностью автоматизированы, в том числе анализы рабочих растворов и подача их на установку. Применение этого метода экономически выгодно, так как фосфорная и уксусная кислоты регенерируются за счет более дешевой серной кислоты. Кроме того, автоматическое поддержание в системе точной концентрации кислоты сокращает время обработки изделий и улучшает качество травления.

Метод ионного обмена между ионами, находящимися в растворе, и ионами, присутствующими на поверхности твердой фазы (ионита), позволяет извлекать и утилизировать из сточных вод ценные примеси (соединения мышьяка, фосфора, а также хром, цинк, свинец, медь, ртуть), радиоактивные вещества. При этом сточная вода может быть очищена до предельно допустимых концентраций вредных веществ и использоваться в технологических процессах или в системах оборотного водообеспечения.

Метод ионного обмена, ранее применявшийся в аналитической химии, в последние годы получает все большее использование в технологии рения. Рений как в щелочных, так и кислых растворах присутствует в виде анионов. Поэтому для его извлечения применимы только аниониты. Максимальная сорбируемость рения на смолах наблюдается в нейтральных растворах. В щелочных и еще сильнее в кислых растворах емкость смол по

рению снижается. Сильноосновные аниониты типа АВ-17, вофатит SBW или амберлит IRA-410 имеют большую емкость по рению в сравнении с низкоосновными. Наибольшую емкость по рению (13 % от массы смолы) имеют смолы АСБФ-1 и ТФФ.

Метод ионного обмена может быть применен и для опреснения минерализованных вод, но большие расходы на технологический процесс получения опресненной воды пока ограничивают его применение.

Метод ионного обмена широко применяется при очистке сточных вод, содержащих ионы тяжелых металлов, антибиотики, ПАВ, красители, органические кислоты. Преимущества этого метода перед традиционными заключаются в возможности утилизации ценных продуктов, содержащихся в сточных водах, сокращении объема сбрасываемых стоков, снижении расхода реагентов, значительном уменьшении площадей, занятых очистными установками.

Метод ионного обмена позволяет определять такие важные характеристики состояния, как знак и значение заряда ионов в растворе, а также является достаточно надежным и удобным для изучения гидролиза и комплексообразования.

Метод ионного обмена на специально подобранных ионитах является весьма эффективным и позволяет достичь степени очистки, удовлетворяющей санитарным нормам. В настоящее время установки очистки сточных вод методом ионного обмена начинают внедряться на предприятиях, однако широкому внедрению пока препятствуют дефицит и высокая стоимость специальных ионообменных смол.

Метод ионного обмена позволяет определить в кремнеземе общее содержание поверхностных (свободных и связанных) гидроксильных групп, чем можно объяснить значительно большие значения концентрации ОН-групп для тех же кремнезёмов.

Метод ионного обмена позволяет извлечь из сточной жидкости ценные вещества и повторно их использовать, однако этот метод эффективен только для очистки прозрачных вод с небольшим солесодержанием.

Метод ионного обмена позволяет концентрировать растворы солей металлов и извлекать из них катионы металлов. Можно отделять анионы, например фосфат-ионы, мешающие определению катионов, или отделять катионы, мешающие определению анионов.

Метод ионного обмена применяется и как метод разделения и как метод концентрирования примесей. В случае концентрирования определенный объем исследуемой жидкости также пропускается через ионообменную колонку, заполненную в соответствии с задачей катионитом или анионитом. При последующей регенерации ионита определенным регенерирующим раствором, объем которого много меньше объема исследуемого раствора, получается концентрированный раствор анализируемых примесей.

Методом ионного обмена наиболее полно изучена химия комплексных соединений нептуния в самом устойчивом - пятивалентном состоянии. Для определения состава и констант устойчивости находят величины коэффициентов распределения N_{Prv} между катионитом и растворами комплексообразователя в выбранных условиях опыта.

Применение метода ионного обмена к исследованию комплексных соединений связано с количественной оценкой равновесия в растворах в присутствии ионообменников.

Преимуществами метода ионного обмена являются: простота и доступность аппаратуры, быстрота метода, высокая избирательность, позволяющая получать в чистом виде близкие по свойствам вещества, возможность регенерации ионита, автоматизации процесса, особенно при разделении радиоактивных веществ, количество которых в фильтрате легко регистрировать измерением радиоактивности вытекающего раствора.

3.1. Цель работы:

Количественное определение нитрата натрия в водном растворе с использованием катионита КУ-2.

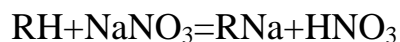
3.2. Объекты и средства исследования.

1. Хроматографическая колонка диаметром 1 см и высотой 25 см, заполненная катионитом КУ-2;
2. Хлороводородная кислота, водный раствор $C(1/1 \text{ HCl}) = 2$ моль/дм³;
3. Гидроксид натрия, водный раствор, $C(1/1 \text{ NaOH}) = 0,1$ моль/дм³;
4. Нитрат натрия, $C(1/1 \text{ NaNO}_3) = 1$ моль/дм³;
5. Бюретка вместимостью 25 см³, 1 шт.;
6. Градуированная пипетка 10 см³, 1 шт.;
7. Мерная колба вместимостью 50 см³, 1 шт.;
8. Колба для титрования вместимостью 100 см³, 1 шт
9. Индикаторы метиловый оранжевый и фенолфталеин.

3.3. Программа работы.

3.3.1. Определение нитрата натрия в растворе методом ионного обмена.

Для перевода в водородную форму суспензию ионита КУ-2 переносят в колонку и пропускают раствор $C(1/1 \text{ HCl}) = 2$ моль/дм³ со скоростью 2-4 см³/мин (100см³). После этого ионит отмывают от кислоты дистиллированной водой, контролируя реакцию среды с помощью универсальной индикаторной бумаги. Над слоем катионита все время должна находиться жидкость высотой не менее 1 см. При образовании в колонке пузырьков катионит взрыхляют стеклянной палочкой или противотоком воды с помощью резиновой груши. Контрольный раствор нитрата натрия, полученный у преподавателя, пропускают через колонку с ионитом со скоростью 1-2 капли в секунду.



Вытекающий из колонки раствор собирают в колбу для титрования.

Для полного вымывания выделившейся азотной кислоты через колонку пропускают 25-30 см³ дистиллированной воды со скоростью 2 капли в секунду, тщательно собирая промывные воды в ту же колбу. Промывание колонки водой заканчивают, когда реакция фильтрата станет нейтральной (контроль по универсальной индикаторной бумаге).

3.3.2. Обработка результатов.

Количество выделившейся азотной кислоты строго эквивалентно количеству нитрата натрия, поэтому оттитровав кислоту гидроксидом натрия с индикатором фенолфталеином можно рассчитать содержание нитрата калия в пробе. Для этого собранный фильтрат доводят до метки 50 см³, отбирают аликвоту 10 см³ и титруют заранее стандартизированным раствором гидроксида натрия.

Объём контрольного раствора NaNO₃ рассчитывают по формуле (3.1):

$$V_{NaNO_3} = \frac{C(1/1NaOH) \cdot V_{NaOH} \cdot 5}{C(1/1NaNO_3)}, \quad (3.1)$$

где $C(1/1 NaOH)$ – концентрация раствора NaOH, моль/дм³;

V_{NaOH} – объем раствора NaOH, израсходованного на титрование содержимого колбы, см³;

$C(1/1 NaNO_3)$ – концентрация раствора NaNO₃, моль/дм³.

Лабораторная работа №4. Газохроматографический метод определения содержания токсичных микропримесей

Введение

Газовая хроматография – метод разделения летучих соединений. Подвижной фазой служит инертный газ, газ-носитель, протекающий через неподвижную фазу, обладающую большой поверхностью. В качестве подвижной фазы используют водород, гелий, азот, аргон, углекислый газ. Газ-носитель не взаимодействует с разделяемыми веществами и с неподвижной фазой.

В зависимости от агрегатного состояния неподвижной фазы различают два вида газовой хроматографии – газо-адсорбционную (неподвижная фаза – твердый носитель: силикагель, уголь, оксид алюминия) и газо-жидкую (неподвижная фаза – жидкость, нанесенная на инертный носитель). Процесс разделения основан на различии в летучести и растворимости (или адсорбируемости) анализируемых компонентов. Например, быстрее через хроматографическую колонку движется тот компонент, растворимость которого в неподвижной фазе меньше, а летучесть (упругость пара) при данной температуре больше.

Газохроматографическим методом могут быть проанализированы газообразные, жидкие и твердые вещества с молекулярной массой меньше 400 кДа, удовлетворяющие определенным требованиям, главные из которых летучесть, термостабильность, инертность и легкость получения. Для быстрого и полного разделения достаточно, чтобы упругость пара была 1–4 мм рт. ст. при рабочей температуре колонки. Более летучим считается вещество, упругость пара которого выше. Количественный анализ можно провести только в том случае, если вещество испаряется в дозаторе воспроизводимо и элюируется без разложения, т.е. является термостойким. При разложении вещества на хроматограмме появляются ложные пики, относящиеся к продуктам разложения. Вещество не должно образовывать

устойчивых сольватов при растворении в неподвижной жидкой фазе, не должно 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 газовая хроматография широко используется как серийный метод анализа органических соединений. Этим методом можно также определять почти все элементы периодической системы в виде летучих комплексов.

В аналитической практике чаще используют метод газо-жидкостной хроматографии. Это связано с чрезвычайным разнообразием жидких неподвижных фаз, что облегчает выбор селективной для данного анализа, с линейностью изотермы распределения в более широкой области концентраций, что позволяет работать с большими пробами и с легкостью получения воспроизводимых по эффективности колонок.

Механизм распределения анализируемых компонентов между носителем и неподвижной жидкой фазой основан на процессе растворения их в жидкой фазе. Селективность зависит от двух факторов: упругости пара анализируемого вещества и коэффициента активности его в жидкой фазе. По закону Рауля при растворении упругость пара вещества над раствором P_i прямо пропорциональна его коэффициенту активности γ , модельной доле N_i в растворе и давлению паров чистого вещества P_i^o при данной температуре:

$$P_i = \gamma N_i P_i^o \quad (4.1)$$

Поскольку концентрация i -го компонента в равновесной паровой фазе определяется его парциальным давлением, можно принять, что $P_i \approx C_m$, а $N_i \approx C_s$. Тогда коэффициент распределения (D)

$$D = \frac{C_s}{C_m} = \frac{N_i}{P_i} = \frac{1}{\gamma P_i^o} \quad (4.2)$$

а коэффициент селективности (α)

$$\alpha = \frac{D_2}{D_1} = \frac{\gamma_1 P_1^o}{\gamma_2 P_2^o}$$

Таким образом, чем ниже температура кипения анализируемого вещества (чем больше P_i^o), тем слабее удерживается оно в хроматографической колонке. Если же температуры кипения веществ одинаковы, то для их разделения используют различия во взаимодействии с неподвижной жидкой фазой: чем сильнее взаимодействие, тем меньше коэффициент активности и тем больше удерживание. Таким образом, чтобы обеспечить селективность колонки очень важно правильно выбрать жидкую фазу.

Неподвижная жидкая фаза должна удовлетворять ряду требований. Прежде всего, она должна быть хорошим растворителем для компонентов смеси (если растворимость мала, компоненты выходят из колонки быстро) и быть нелетучей (чтобы не происходило ее испарения при рабочей температуре колонки). Она должна быть химически инертна, обладать небольшой вязкостью (иначе замедляется процесс диффузии). При нанесении на носитель фаза должна образовывать равномерную пленку, прочно связанную с носителем. Разделительная способность ее для компонентов данной пробы должна быть максимальной.

Различают жидкие фазы трех типов: неполярные (насыщенные углеводороды и др.), умеренно полярные (сложные эфиры, нитрилы и др.). Зная свойства неподвижной жидкой фазы и природу разделяемых веществ, например, класс, строение, можно достаточно быстро подобрать подходящую для разделения данной смеси селективную жидкую фазу. При выборе следует учитывать, что время удерживания компонентов будет приемле-

мым для анализа, если полярность стационарной фазы и веществ анализируемой пробы близки. Для растворенных веществ с близкой полярностью порядок элюирования обычно коррелирует с температурами кипения и если разница температур достаточно велика, возможно полное разделение.

Для разделения близкокипящих веществ разной полярности используют стационарную фазу, селективно удерживающую один или несколько компонентов благодаря диполь-дипольному взаимодействию. С увеличением полярности жидкой фазы времена удерживания полярных соединений увеличиваются.

4.1. Цель работы:

Определение содержания токсичных микропримесей в этиловом спирте методом газовой хроматографии с использованием капиллярных колонок.

4.2. Объекты и средства исследования.

1. Газовый хроматограф с пламенно-ионизационным детектором, с уровнем шумов нулевого сигнала не более $2 \cdot 10^{-14}$ А, с дрейфом нулевого сигнала детектора не более $2 \cdot 10^{-12}$ А/ч, с пределом детектирования не более $2 \cdot 10^{-12}$ гС/с.
2. Колонка газохроматографическая капиллярная DB-FFAP. Допускается применение других капиллярных колонок с аналогичными техническими характеристиками, обеспечивающими аналогичное разделение.
3. Компьютер с соответствующим программным обеспечением
4. Газ-носитель — гелий или азот сжатый марки А в баллоне по ГОСТ 9293 или азот особой чистоты по ГОСТ 9293.
5. Водород технический марки А по ГОСТ 3022. Допускается использование генератора водорода.
6. Воздух сжатый по ГОСТ 17433. Допускается использовать компрессоры любого типа, обеспечивающие необходимое давление и чистоту воздуха.

7. Микрошприц вместимостью 10 мкл.
8. Вода дистиллированная.
9. Спирт этиловый ректификованный.
10. Метанол, для хроматографии.
11. Уксусный альдегид, х.ч.
12. Метиловый эфир уксусной кислоты, х.ч.
13. Этиловый эфир уксусной кислоты, х.ч.
14. Пропанол-1, для хроматографии.
15. Спирт изобутиловый, х.ч.
16. Бутанол-1, для хроматографии.
17. Спирт изоамиловый, х.ч.
18. Мерная колба на 100 мл.
19. Пипетки мерные.
20. Термометр жидкостный стеклянный.
21. Слянка для хранения градуировочной смеси любого типа пробкой, обеспечивающей герметичность.

4.3. Программа работы.

4.3.1. Приготовление градуировочных смесей.

Монтаж, наладку и вывод хроматографа на рабочий режим проводят в соответствии с инструкцией, прилагаемой к прибору. Прибор градуируют по искусственным смесям методом абсолютной градуировки. Состав градуировочной смеси должен быть близким к анализируемым пробам.

Для анализа с использованием капиллярных колонок градуировочная смесь должна содержать следующие чистые вещества: уксусный альдегид, метиловый эфир уксусной кислоты, этиловый эфир уксусной кислоты, метиловый спирт, пропанол-1, изобутиловый спирт, бутанол-1, изоамиловый спирт. При анализе водок в мерную колбу с пришлифованной пробкой вместимостью 100 см³ наливают 50 см³ водно-спиртового раствора объемной долей ректификованного этилового спирта 40% и вносят пипетками

вместимостью 0,1 см³ по 0,1 см³ каждого чистого вещества. Содержимое колбы перемешивают, доводят до метки водно-спиртовым раствором объемной долей ректифицированного этилового спирта 40% и выдерживают при температуре 20°C в течение 25 мин.

4.3.2. Проведение анализа.

Газовый хроматограф включают в соответствии с инструкцией по его эксплуатации и устанавливают параметры хроматографирования.

Условия хроматографирования с капиллярными колонками:

- Газохроматографическая капиллярная колонка: DB-FFAP (США) 50м*0,32мм*0,50мкм;
- температура термостата — 60 — 75°C;
- температура испарителя (инжектора) — 200°C.
- инжектор с делением потока – коэффициент деления потока 40:1.
- детектор ионизации в пламени (ДИП):
- температура детектора — 200 — 250°C;
- расход воздуха — 18 дм³/ч;
- расход водорода — 1,8 дм³/ч;
- скорость потока газа-носителя — 0,072 — 0,144 дм³/ч;
- объем пробы — 1 мм³.

Для получения градуировочных данных используют не менее трех градуировочных смесей, одна из которых должна иметь концентрацию, близкую к нижней границе определяемых содержаний.

Записывают хроматограммы анализа каждой градуировочной смеси. Регистрируют время удерживания и площади пиков определяемых веществ. Порядок выхода пиков представлен на рисунке 6.1.

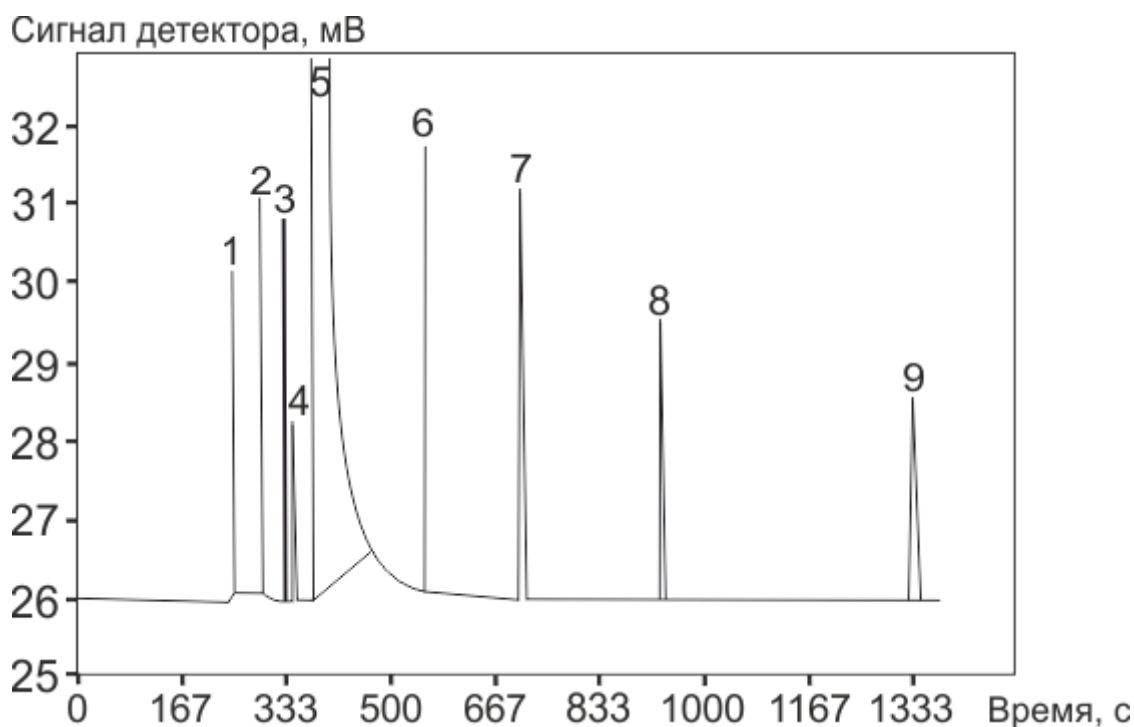


Рисунок 4.1. Хроматограмма стандартной градуировочной смеси (1 – уксусный альдегид, 2 – метиловый эфир уксусной кислоты, 3 – этиловый эфир уксусной кислоты, 4 – метиловый спирт, 5 – этиловый спирт, 6 – пропанол-1, 7 – изобутиловый спирт, 8 – бутанол-1, 9 – изоамиловый спирт).

В испаритель (инжектор) вводят 1 мм^3 образца водки и осуществляют хроматографическое разделение. Регистрируют пики в области времени удерживания, соответствующие компонентам градуировочной смеси. По полученным хроматограммам можно рассчитать концентрации примесей в анализируемых образцах водки по формуле:

$$w = \frac{w_0 \cdot \bar{h}}{h_0} \quad (4.3)$$

4.3.3. Обработка экспериментальных данных.

Количественной мерой эффективности хроматографической колонки являются число теоретических тарелок N и высота, эквивалентная теоретической тарелке ВЭТТ. Теория теоретических тарелок даёт возможность

сравнить эффективность различных колонок, оценить качество сорбента и качество заполнения колонки.

Число теоретических тарелок N определяли по данным хроматограммы. Для этого проводили касательные в точках перегиба пика, как показано на рисунке 4.2, расчет числа теоретических тарелок осуществляли по формуле:

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 \quad (4.4)$$

где w – ширина пика у основания, t_R – время удерживания.

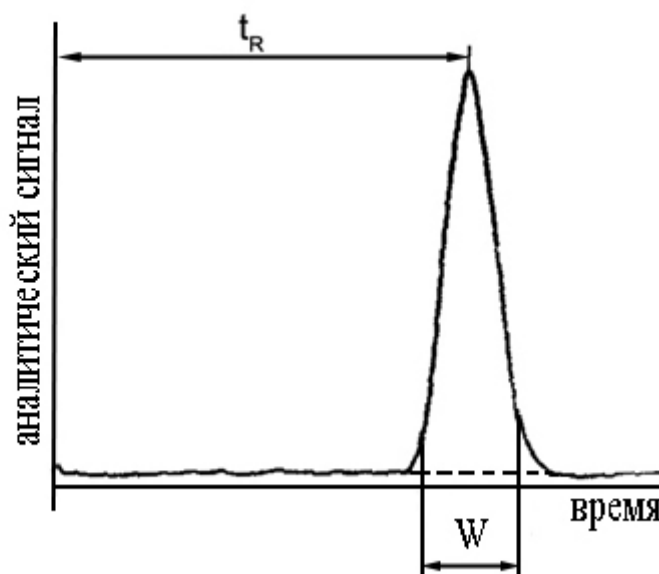


Рисунок 4.2. Расчет числа теоретических тарелок.

Высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ) связана с числом теоретических тарелок N следующим уравнением:

$$\text{ВЭТТ} = \frac{L}{N} \quad (4.5)$$

где L – длина хроматографической колонки.

Выбор условий хроматографического анализа смеси веществ имеет целью разделение компонентов в такой степени, чтобы стал возможным количественный анализ состава пробы. Разделение двух или более веществ зависит от различия между их характеристиками удерживания, а также от эффективности колонки. Истинное разделение двух соседних пиков харак-

теризуется разрешением R_s , которое является мерой эффективности как колонки, так и жидкой фазы. Оно определяет как остроту пиков, так и расстояние между их максимумами.

Разрешение определяют по формуле:

$$R_s = \frac{2d}{w_1 + w_2} \quad (4.6)$$

где d – расстояние между максимумами пиков,

w_1 и w_2 – ширина оснований пиков (рисунок 4.3)

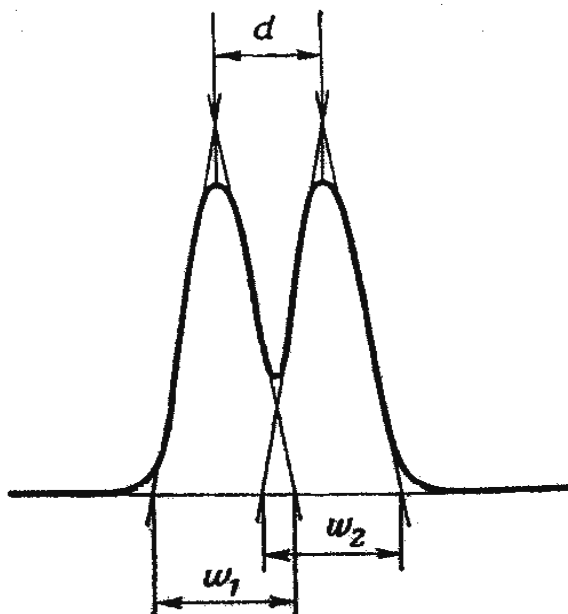


Рисунок 4.3. Определение разрешения соседних пиков.

Если разрешение R_s равно 1, то разделение двух пиков равной площади составляет примерно 98% полного разделения, если R_s равно 1,5 - то достигается почти полное разделение пиков (99,7 % полного разделения).

Хроматографическое разделение основано на селективности сорбента и различии в термодинамических свойствах анализируемых веществ в системе сорбент – элюент. Коэффициент селективности (фактор разделения) α характеризует эффективность выбранной жидкой фазы и является мерой относительного удерживания разделяемых веществ. Коэффициент селективности вычисляется по формуле, как отношение приведенных времен удерживания компонентов t'_R .

$$\alpha = \frac{t'_{R_2}}{t'_{R_1}} \quad (4.7)$$

где $t'_R = t_R - t_0$, t_0 – время удерживание абсолютно несорбируемого компонента (мертвое время колонки).

Полезным параметром в хроматографии является коэффициент удерживания (замедления) R – отношение скорости движения вещества к скорости движения растворителя:

$$R = \frac{t_0}{t_R} \quad (4.8)$$

Таким образом, R показывает, какую долю времени вещество находится в подвижной фазе. Для неудерживаемого вещества $t_R = t_0$ и $R = 1$. Если время пребывания в анализируемого компонента в подвижной и неподвижной фазах одинаково, то $R = 0,5$.

Коэффициент ёмкости (k') показывает, во сколько раз вещество дольше находится в неподвижной фазе, чем в подвижной:

$$k' = \frac{t' \times R}{t_0} \quad (4.9)$$

Оптимальные значения k' лежат в пределах 1,5—4. Если коэффициент распределения мал, то мало значение k' , т. е. вещество слабо удерживается и продвигается по колонке практически с той же скоростью, что и подвижная фаза. Если же коэффициент ёмкости слишком велик, то время пребывания вещества в колонке будет большим и на анализ потребуется много времени.

Лабораторная работа № 5. Определение нефтепродуктов (на примере гексадекана) в ростовых средах методом газовой хроматографии

Введение

Гексадекан (*цетан*) $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{CH}_3$ — ациклический насыщенный углеводород нормального строения. Цетан используют как эталон для оценки качества (цетанового числа) дизельного топлива, считая его цетановое число за 100, а так же является компонентом нефти. Практически все углеводороды, входящие в состав нефти, могут быть объектом микробиологического воздействия. Углеводороды в почве разлагаются в результате деятельности углеродоокисляющих микроорганизмов, способных окислять углеводороды до CO_2 и воды или превращать их в соединения, утилизируемые другими микроорганизмами.

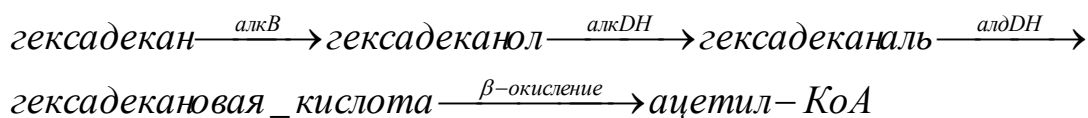
По степени снижения окисляемости микроорганизмами компоненты нефти и нефтепродуктов располагаются в такой последовательности:

н-алканы → разветвленные алканы → разветвленные алкены → низкомолекулярные н-алкил ароматические соединения → моноароматические соединения → полициклические ароматические углеводороды → асфальтены.

Из всех компонентов нефти наиболее доступны для биodeградации н-алканы $\text{C}_{12}-\text{C}_{22}$. Оптимальные для роста микроорганизмов концентрации н-алканов в различных средах варьируют от 0,5 до 2–5%. Ароматические углеводороды более токсичны, поэтому оптимальными для их биodeградации являются концентрации в 10–100 раз меньшие, чем концентрации н-алканов. Наиболее труднодоступны для биodeградации полициклические ароматические углеводороды. Нефть и ее фракции обладают, как правило, средней доступностью для микроорганизмов, однако токсичность сырой нефти часто бывает усугублена примесями сернистых соединений и тяжелыми металлами.

Наиболее распространенным путем ассимиляции углеводов является монотермальное окисление, которое характеризуется гидроксильрованием одного концевых атома углерода цепи *n*-алкана в первичную спиртовую группу. В этом случае молекулярный кислород используется только для получения первичного спирта, дальнейшее окисление происходит с помощью алкоголь- и альдегидогеназ.

Метаболическое превращение гексадекана протекает следующим образом:



Дальнейшее окисление протекает по пути, известному как бета-окисление жирных кислот, при котором за каждый цикл длина цепочки жирной кислоты укорачивается на два углеродных атома.

В целом можно сказать, что все или почти все углеводороды низкомолекулярной фракции нефти в сравнительно короткие сроки удаляются из среды: одни за счет испарения, а другие за счет метаболической активности углеродоокисляющих микроорганизмов.

5.1. Цель работы:

Определение содержания гексадекана в ростовой среде методом газовой хроматографии с использованием капиллярных колонок.

5.2. Объекты и средства исследования.

1. Газовый хроматограф с пламенно-ионизационным детектором, с уровнем шумов нулевого сигнала не более $2 \cdot 10^{-14}$ А, с дрейфом нулевого сигнала детектора не более $2 \cdot 10^{-12}$ А/ч, с пределом детектирования не более $2 \cdot 10^{-12}$ гС/с.

2. Колонка газохроматографическая капиллярная SGEAnalyticalScienceforteGCCapillaryColumnBP1 J08 30м*0,3мм*0,53мкм. Допускается применение других капиллярных колонок с аналогичными технически-

ми характеристиками, обеспечивающими аналогичное разделение.

3. Компьютер с соответствующим программным обеспечением
4. Газ-носитель — гелий или азот сжатый марки А в баллоне по ГОСТ 9293 или азот особой чистоты по ГОСТ 9293.
5. Водород технический марки А по ГОСТ 3022. Допускается использовать генераторы водорода.
6. Воздух сжатый по ГОСТ 17433. Допускается использовать компрессоры любого типа, обеспечивающие необходимое давление и чистоту воздуха.
7. Микрошприц вместимостью 10 мкл.
8. Вода дистиллированная.
9. Гексадекан, х.ч.
10. Гексан, х.ч.
11. Мерная колба на 100 мл.
12. Пипетки мерные.
13. Слянка для хранения градуировочной смеси любого типа пробкой, обеспечивающей герметичность.

5.3. Программа работы.

5.3.1. Приготовление градуировочных смесей.

Монтаж, наладку и вывод хроматографа на рабочий режим проводят в соответствии с инструкцией, прилагаемой к прибору. Прибор градуируют по искусственным смесям методом абсолютной градуировки. Состав градуировочной смеси должен быть близким к анализируемым пробам. Для построения градуировочной зависимости готовят серию из 5 растворов с различным содержанием гексадекана в гексане: 1, 5, 10, 15, 25%.

5.3.2. Пробоподготовка.

Исследуемый образец (250 мл) подкисляли 1,5 мл серной кислоты (1:1) и дважды экстрагировали н-гексаном (по 25 мл) в стеклянной делительной воронке емкостью 1 л в течение 5 мин при периодическом встря-

хивании содержимого воронки.

После расслаивания жидкостей слой н-гексана, содержащий извлеченные НП, отделяли от водного слоя и пропускали через стеклянную колонку (15 см х 1 см) с оттянутым нижним концом, заполненную оксидом алюминия, для отделения полярных соединений.

Оксид алюминия (II степени активности, «для хроматографии») прокачивали в муфельной печи в течение 3-х ч при 600°C и после охлаждения помещали в стеклянную колбу с притертой пробкой, добавляли дистиллированную воду в количестве 4% от массы адсорбента и встряхивали в течение 1-2 мин. Использовали через сутки.

5.3.3. Проведение анализа.

Газовый хроматограф включают в соответствии с инструкцией по его эксплуатации и устанавливают параметры хроматографирования.

Условия хроматографирования с капиллярными колонками:

- Газохроматографическая капиллярная колонка: SGEAnalyticalScienceforteGCCapillaryColumnBP1 J08 30м*0,3мм*0,53мкм;
- температура термостата — 250°C;
- температура испарителя (инжектора) — 300°C.
- инжектор с делением потока – коэффициент деления потока 1:1.
- детектор ионизации в пламени (ДИП):
- температура детектора — 200 — 250°C;
- расход воздуха — 18 дм³/ч;
- расход водорода — 1,8 дм³/ч;
- скорость потока газа-носителя — 17,4 см³/мин
- объем пробы — 1 мм³.

Для определения гексадекана методом газовой хроматографии на следующем этапе работы построили градуировочную зависимость площади пика на хроматограмме от содержания гексадекана. Каждый градуиро-

вочный раствор измеряют по три раза. На основе полученных данных строится градуировочная зависимость площади пика на хроматограмме от концентрации гексадекана. Порядок выхода пиков представлен на рисунке 5.1.

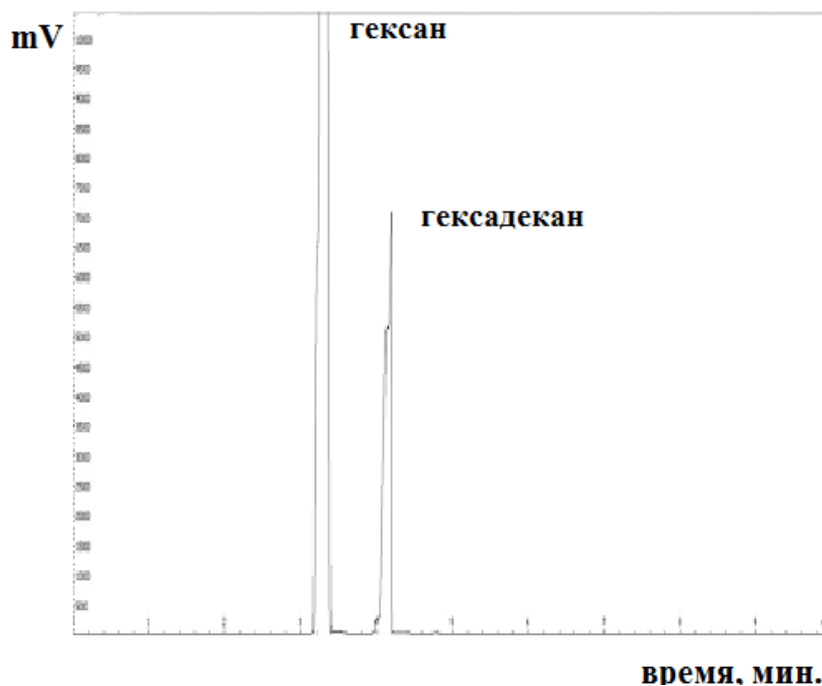


Рисунок 5.1. Хроматограмма гексадекана, растворитель гексан.

В испаритель (инжектор) вводят 1 мм³ образца экстракта и осуществляют хроматографическое разделение. Регистрируют пики в области времени удерживания, соответствующие компонентам градуировочной смеси. По полученным хроматограммам можно рассчитать концентрацию гексадекана с использованием градуировочной зависимости.

5.3.4. Обработка экспериментальных данных.

Обработка экспериментальных данных проводится согласно пункту 4.3.3. лабораторной работы № 4

Лабораторная работа №6. Измерение массовой концентрации углеводов в напитках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Введение

Жидкостная хроматография (ЖХ) - метод разделения и анализа сложных смесей веществ, в котором подвижной фазой является жидкость. Подвижная фаза в жидкостной хроматографии выполняет двойную функцию:

- 1) обеспечивает перенос десорбированных молекул по колонке (подобно подвижной фазе в газовой хроматографии);
- 2) регулирует константы равновесия, а, следовательно, и удерживание в результате взаимодействия с неподвижной фазой (сорбируясь на поверхности) и с молекулами разделяемых веществ.

В ЖХ природа подвижной фазы имеет существенно большее значение. В результате комбинации ограниченного числа сорбентов и неограниченного числа, различных по составу, подвижных фаз возможно решение чрезвычайно большого числа встречающихся на практике задач. ЖХ подразделяется на варианты в соответствии с характером основных проявляющихся межмолекулярных взаимодействий:

- в ситовой хроматографии разделение компонентов осуществляется за счет разницы в растворимости молекул при их прохождении (фильтрации) через слой сорбента;
- в адсорбционной хроматографии – за счет разницы в адсорбируемости молекул, проходящих через слой частиц сорбента, покрытых неподвижной фазой в виде тонкого слоя или поверхностнопривитых радикальных групп;
- в ионообменной и ионной хроматографии – за счет разницы в способности к обмену ионами с ионообменниками;

Для анализа объектов окружающей среды наиболее широко используют ВЭЖХ в адсорбционном и ионообменном вариантах.

В зависимости от природы подвижной (ПФ) и неподвижной (НФ) фазы различают нормально-фазовую (НФХ) и обращенно-фазовую (ОФХ) хроматографию. В нормально-фазовой ВЭЖХ НФ – полярная (чаще всего силикагель), а ПФ – неполярная (гексан, либо смеси гексана с более полярными органическими растворителями – хлороформом, спиртами и т.д.). Удерживание веществ растет с увеличением их полярности. Разделения компонентов достигают, меняя элюирующую силу подвижной фазы, которая зависит от энергии взаимодействия компонентов ПФ с поверхностью НФ. В нормально-фазовой хроматографии элюирующая способность ПФ увеличивается с ростом ее полярности.

В обращенно-фазовой хроматографии неподвижная фаза – неполярная (гидрофобные силикагели с привитыми группами C8, C18); ПФ – полярная (смеси воды и полярных растворителей: ацетонитрила, метанола, тетрагидрофурана и др.). Удерживание веществ растет с увеличением их гидрофобности (неполярности). Наименьшей элюирующей способностью обладает вода, а для повышения элюирующей способности в ПФ вводят ацетонитрил, метанол и другие растворители. Чем больше содержание органического растворителя, тем выше элюирующая способность подвижной фазы.

Метод ЖХ применим для разделения значительно более широкого круга веществ, чем газовая хроматография, поскольку большая часть веществ не обладает летучестью, а многие вещества неустойчивы при высоких температурах. В ЖХ разделение обычно происходит при комнатной температуре. Быстрый массоперенос при высокой эффективности разделения позволяет использовать ВЭЖХ для разделения и определения молекул (адсорбционная и распределительная хроматографии), для разделения и определения ионов (ионообменная, ионная, ион-парная хроматографии),

для разделения макромолекул (эксклюзионная хроматография). Методами аффинной и лигандообменной хроматографии разделяют биологически активные молекулы и оптические изомеры.

6.1. Цель работы:

Знакомство с методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, определение массовой концентрации углеводов в напитках методом ВЭЖХ с использованием рефрактометрического детектора.

6.2. Объекты и средства исследования.

1. Хроматограф для ВЭЖХ с рефрактометрическим детектором, термостатируемой хроматографической колонкой и программно-аппаратным комплексом сбора и обработки данных типа «Millenium2000».
2. Колонка аналитическая длиной 300 мм и внутренним диаметром 6,5 мм, заполненная сульфированным сополимером полистирола и дивинилбензола в кальциевой ионной форме размером частиц 30 мкм.
3. Бумага фильтровальная лабораторная.
4. Микрошприцы для ВЭЖХ, вместимостью 10, 100 и 250 мкл.
5. Весы лабораторные по ГОСТ 24104 с пределом допускаемой абсолютной погрешности однократного взвешивания 10,1 мг.
6. Центрифуга лабораторная с величиной фактора разделения (g-фактор) 800—1000.
7. Аппарат для встряхивания проб типа АБУ-6С.
8. Фильтры мембранные с диаметром пор 0,20 или 0,45 мкм для фильтрации подвижной фазы и проб.
9. Фильтры обеззоленные.
10. Пипетки градуированные 2-го класса или дозаторы пипеточные с аналогичным или изменяемым объемами доз с относительной погрешностью дозирования $\pm 1\%$.
11. Колбы мерные с притертой пробкой вместимостью 100, 1000 см³ с одной меткой.

12. Шприц медицинский вместимостью 5 см³.
13. Емкости для жидких проб (вials) вместимостью 2—6 см³.
14. Установка для дегазации элюента.
15. Посуда лабораторная стеклянная: колбы круглодонные вместимостью 1000 см³, воронки лабораторные, стаканы вместимостью 50, 100 и 1000 см³.
16. Вода дистиллированная.
17. Кальциевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (Са-ЭДТА). Раствор массовой концентрации 10 – 20 мг/дм³.
18. Глюкоза с массовой долей основного вещества не менее 99,0 %.
19. Фруктоза с массовой долей основного вещества не менее 99,0 %.
20. Сахароза с массовой долей основного вещества не менее 99,0 %.
21. Сорбит с массовой долей основного вещества не менее 99,0 %.

6.3. Программа работы.

6.3.1. Подготовка проб для измерений.

Для определения массовой концентрации сахарозы, глюкозы, фруктозы и сорбита осветленную соковую продукцию, не содержащую не растворимые в воде вещества, разбавляют дистиллированной водой в соотношении 1:20. Для этого пипеткой отбирают 5 см³ пробы, помещают в мерную колбу вместимостью 100 см³, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают.

Затем 1—2 см³ пробы отбирают в медицинский шприц через иглу, после этого заменяют иглу на фильтр с диаметром пор 0,45 или 0,20 мкм и отфильтровывают в вialу.

Для определения массовой концентрации сахарозы, глюкозы, фруктозы и сорбита соковую продукцию, с мякотью или содержащую не растворимые в воде вещества, разбавляют в соотношении 1:20. Для этого пипеткой отбирают 5 см³ пробы, помещают в мерную колбу вместимостью 100 см³, доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают. За-

тем пробу центрифугируют с фактором разделения не менее 990 g в течение 15 мин, после этого с помощью пипетки аккуратно отбирают 5 см³ осветленного водного слоя, помещают в мерную колбу вместимостью 100 см³, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают. При необходимости после разбавления возможно повторное центрифугирование или фильтрование через бумажный фильтр.

Затем 1- 2 см³ пробы отбирают в медицинский шприц через иглу, после этого заменяют иглу на фильтр с диаметром пор 0,45 или 0,20 мкм и отфильтровывают в виалу.

Определение массовой доли сахарозы, глюкозы, фруктозы и сорбита в концентрированных соках проводят после предварительного разбавления пробы дистиллированной водой весовым методом в соотношении 1:100. Для этого взвешивают около 0,5—1,0 г концентрированного сока с записью результата до третьего знака после запятой и массу доводят дистиллированной водой до получения общей массы пробы 50—100 г с записью результата до третьего знака после запятой. Полученную общую массу раствора также взвешивают с записью результата до третьего знака после запятой. Делением общей массы раствора на массу навески концентрированного сока вычисляют величину разбавления (разведения), которую учитывают при вычислениях.

Затем отбирают в медицинский шприц через иглу около 2 см³ полученного раствора, заменяют иглу на фильтр с диаметром пор 0,20 мкм (для концентрированных соков, не содержащих не растворимых в воде веществ) или с диаметром пор 0,45 мкм (для концентрированных соков, содержащих не растворимые в воде вещества) и отфильтровывают в виалу 1 см³ этого раствора.

6.3.2. Приготовление стандартных градуировочных растворов смеси углеводов (сахарозы, глюкозы, фруктозы) и сорбита.

Стандартные градуировочные растворы смеси углеводов (сахарозы, глюкозы, фруктозы) и сорбита готовят для одновременной градуировочной зависимости по четырем точкам, от меньшей массовой концентрации или массовой доли сахарозы, глюкозы, фруктозы и сорбита к большей, из основного стандартного раствора № 1 в соответствии с таблицей 6.1.

Таблица 6.1.

Приготовление стандартных градуировочных растворов смеси углеводов (сахарозы, глюкозы, фруктозы) и сорбита.

№ станд. раствора	объем колбы, мл	Способ приготовления	Массовая концентрация г/дм ³
1	100	Взвешивают по 1,60 г сахарозы, глюкозы, фруктозы и сорбита, переносят в мерную колбу вместимостью 100 см ³ , доводят водой до метки и тщательно перемешивают.	16,0
2	50	Отбирают 1,56 см ³ раствора № 1, переносят в мерную колбу, доводят водой до метки и тщательно перемешивают.	0,5
3	50	Отбирают 3,13 см ³ раствора № 1, переносят в мерную колбу, доводят водой до метки и тщательно перемешивают.	1,0

4	50	Отбирают 12.5 см ³ раствора № 1, переносят в мерную колбу, доводят водой до метки и тщательно перемешивают.	4,0
---	----	--	-----

Стандартные градуировочные растворы готовят непосредственно перед проведением измерений. Порядок элюирования углеводов и сорбита следующий: сахароза, глюкоза, фруктоза, сорбит.

6.3.3. Проведение измерений методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Хроматограф включают в соответствии с инструкцией по его эксплуатации и устанавливают параметры хроматографирования:

- Колонка аналитическая: длиной 300 и внутренним диаметром 6,5 мм, заполненная сульфированным сополимером полистирола и дивинилбензола в кальциевой ионной форме, размер частиц 30 мкм.
- Элюент раствор Са-ЭДТА 0,03 — 0,1 ммоль/дм³ или вода.
- Температура колонки: 80 – 90°C (или рекомендуемая производителем колонки).
- Детектирование: рефрактометрическое.
- Скорость потока подачи элюента. 0,5 см³/мин (или рекомендуемая производителем колонки).
- Объем вводимой пробы: 10 – 20 мкл (объем вводимой пробы выбирают в соответствии с техническими характеристиками рефрактометрического детектора при оптимизации метода).

Пример хроматограммы модельной смеси сахарозы, фруктозы, глюкозы и сорбита приведен на рисунке 6.1.

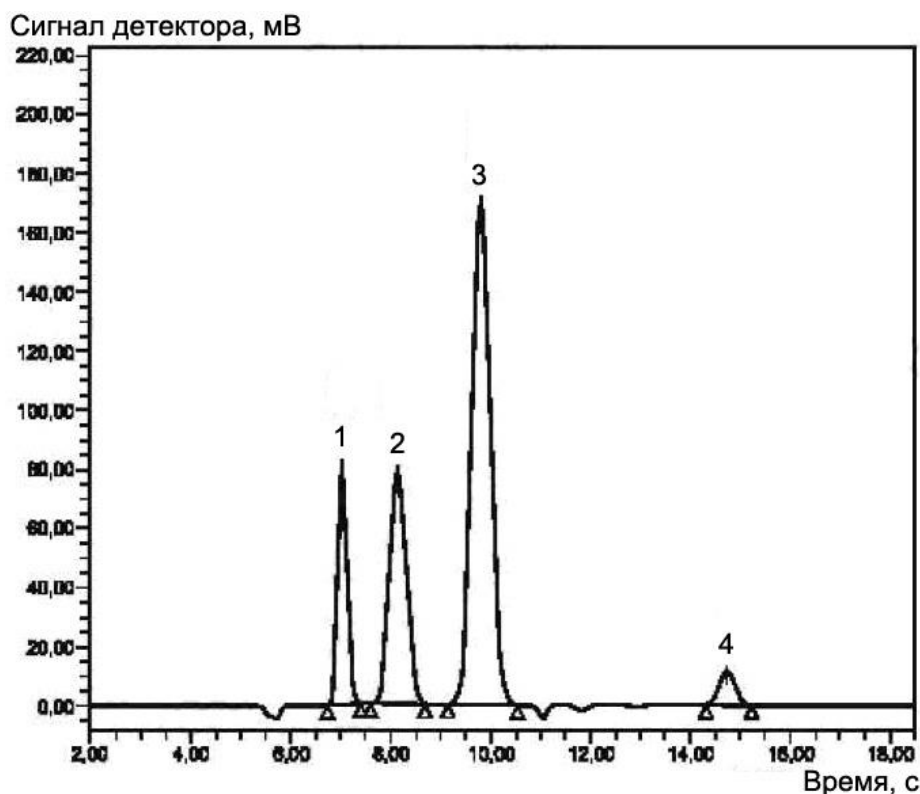


Рисунок 6.1. Хроматограмма стандартного раствора (1 – сахароза; 2 – глюкоза; 3 – фруктоза; 4 – сорбит).

Проводят хроматографический анализ всех градуировочных растворов смеси сахарозы, глюкозы, фруктозы и сорбита. Регистрируют площади пиков отдельных компонентов и строят градуировочный график – зависимость площади пика от массовой концентрации или массовой доли компонента в градуировочном растворе.

Градуировочную зависимость выражают линейным уравнением:

$$y = kx. \quad (6.1)$$

Правильность построения градуировочной зависимости контролируется величиной достоверности аппроксимации (R^2),

$$R^2 \geq 0,9997 \quad (6.2)$$

Проводят хроматографический анализ подготовленных проб. Каждую пробу продукта анализируют два раза в условиях повторяемости. Регистрируют площади пиков углеводов и сорбита. В случае, если площадь соответствующего пика выходит за границы диапазона градуировки хро-

матографа, готовят новую менее или более разбавленную пробу и анализ повторяют.

Массовые концентрации или массовые доли углеводов и сорбита C (г/дм³ или %) находят исходя из построенной градуировочной зависимости по уравнению:

$$C = \frac{S}{k} \quad (6.3)$$

где k - градуировочный коэффициент соответствующей зависимости.

6.3.4. Обработка экспериментальных данных.

Обработку экспериментальных данных проводят в соответствии с пунктом 4.3.3. лабораторной работы № 4.

Лабораторная работа № 7. Разделение смеси белков методом ионообменной хроматографии

Введение

В отличие от низкомолекулярных веществ, белки предъявляют к сорбентам особые требования. Главное из них – это «рыхлость» структуры сорбента, чтобы белок мог проникнуть внутрь частиц и достичь центров связывания. Кроме того, материал сорбента не должен взаимодействовать с белком. Этим требованиям не отвечают полистирольные смолы, и для разделения белков используют ионообменники на основе целлюлозы, декстранов и агароз.

Таблица 7.1.

Наиболее известные ионообменники.

	Тип ионообменника	Название	Заряженная группа
На основе целлюлозы	Катионообменник	КМ-целлюлоза (карбоксиметилцеллюлоза)	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$
	Анионообменник	ДЭАЭ-целлюлоза (диэтиламиноэтилцеллюлоза)	+ $-\text{O}-\text{C}_2\text{H}_4\text{NH}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$
	Катионообменник	Фосфоцеллюлоза	$-\text{O}-\text{PO}_3^-$
	Анионообменник	ТЭАЭ-целлюлоза (триэтиламиноэтилцеллюлоза)	+ $-\text{O}-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$
На основе декстранов	Катионообменник	КМ-сефадекс (карбоксиметилсефадекс)	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$
	Катионообменник	СП-сефадекс (сульфопропилсефадекс)	$-\text{O}-(\text{CH}_2)_3-\text{SO}_3^-$
на основе сефарозы	Катионообменник	КМ-сефароза (карбоксиметилсефароза)	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$

	Анионообмен- ник	ДЭАЭ- сефароза (диэти- ламиноэтилсефароза)	+ -O-C ₂ H ₄ NH(C ₂ H ₅) ₂
--	---------------------	---	---

Белки связываются ионообменником с помощью электростатических сил между заряженными группами белков и кластерами заряженных групп на ионообменнике. Степень модификации КМ или ДЭАЭ-целлюлозы высока – до 0,5 ммоль/см³. Заряды, нейтрализованы противоионами, такими как ионы металлов, хлорид - ионы и ионы буфера. Белок должен вытеснить противоионы, отсюда происходит термин «ионный обмен».

Количество белка, которое может связать ионообменник в расчете на единицу объема, может быть очень большим. У ионообменников на основе целлюлозы это количество зависит в основном от размеров белковых молекул, – чем мельче молекулы белка, тем в большей степени он адсорбируется. Молекулы белков с молекулярной массой более 10⁶ не задерживаются большинством целлюлозных ионообменников. Ионообменники на основе сефадекса и сефарозы комбинируют ионный обмен с эффектом молекулярного сита.

Можно привести примеры выбора ионообменника для очистки белка с известной изоэлектрической точкой. Предполагается, что белок стабилен при pH 5,5-8,5.

Таблица 7.2.

Выбор ионообменника для белков с известной изоэлектрической точкой

Изоэлектрическая точка	Ионный обмен	pH буфера
8,5	Катион	<7,0
7,0	Катион	<6,0
6,0	Анион	>8,0
5,5	Анион	>6,5

Имеется в виду, что при значениях pH буфера ниже изоэлектрической, белок имеет положительный заряд и адсорбируется на катионообменнике и наоборот.

На практике условия адсорбции выбирают эмпирически, так как чаще всего изоэлектрическая точка белка неизвестна. Хотя изоэлектрическую точку фермента можно определить методом изоэлектрического фокусирования в сочетании со специфическим окрашиванием на ферментативную активность, но иногда проще провести эксперимент с применением ионообменников.

Для испытания адсорбционной способности ДЭАЭ-целлюлозы обычно используют 20 ммоль/дм³ трис-буфер pH 8,0. Для этого достаточно небольшой колонки объемом около 2 мл. Если фермент не адсорбировался на ДЭАЭ-целлюлозе, то: а) возможно все-таки произошла его очистка, так как могли адсорбироваться балластные белки, б) фермент, вероятно, будет сорбироваться на катионообменнике (КМ-целлюлозе).

Десорбируют белки раствором NaCl с концентрацией 2 моль/дм³, при такой ионной силе элюируются практически все белки. Затем проводят проверку, чтобы убедиться, что фермент сошел с колонки. Следующим этапом работы является подбор условий элюции для разделения белков.

Следует обратить внимание на некоторые особенности работы с ионообменниками. Образец необходимо наносить в том же буфере, который используют для уравнивания колонки. Для перевода в нужный буфер используют диализ или гель-фильтрацию. Например, 1 мл препарата пропускают через колонку с сефадексом G-25 объемом 10 мл, уравновешенную нужным буфером, за 10 мин. Концентрация белка в образце может достигать 30 мг/мл. В ионообменной хроматографии применяют короткие и толстые колонки, длина которых в 4-5 раз превышает их диаметр. Никогда не следует наносить образец, в котором есть осадок, его надо сначала

отделить центрифугированием. Осадок может привести к закупорке колонки.

Теоретически существуют два способа элюции белков.

1) Изменение pH буфера до величины, при которой связывание белка с адсорбентом ослабевает; для анионообменников используют более низкие значения pH, а для катионообменников – более высокие.

2) Повышение ионной силы, что вызывает ослабление электростатического взаимодействия между белком и адсорбентом.

На практике метод 1 не всегда дает хорошие результаты из-за буферных свойств самих белков, а в некоторых случаях и адсорбента. Более распространенные способы элюции – солевые градиенты (ступенчатые и линейные). Обычно используют хлориды калия или натрия, линейный градиент создают при помощи простого смесителя, работающего на принципе сообщающихся сосудов. При повышении концентрации соли белки начинают двигаться вниз, но перемещаются с меньшей скоростью, чем соль, поэтому каждая часть белковой зоны испытывает действие повышенной концентрации соли. Это приводит к тому, что зоны сужаются.

7.1. Цель работы:

Разделение модельной смеси белков методом ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-сефарозе.

7.2. Объекты и средства исследования.

1. Хроматографическая система BioLogicLP производство BIO-RAD.
2. Спектрофотометр СФ-103.
3. Микропробирки типа erpendorf.
4. Автоматические пипетки переменного объема.
5. Фосфатный буфер pH=6,0, 20 ммоль/дм³.
6. 1моль/дм³раствор NaCl.

7. Раствор, содержащий смесь белков - глюкозооксидазы (1 мг/мл) и пероксидазы хрена (1 мг/мл).
8. 100 ммоль/дм³ калий-фосфатный буфер рН=6,0. (*Реактив А*)
9. 0,5% раствор о-дианизидина в 1 мл метанола. (*Реактив В*)
10. Раствор о-дианизидина в буфере. 0,2 мл реактива В в 24 мл реактива А. (*Реактив С*)
11. 1 моль/дм³ раствор глюкозы. (*Реактив D*)
12. Раствор пероксидазы хрена 300 Е/мл. (*Реактив E*)
13. Раствор фермента глюкозооксидазы (30 Е/мл).

7.3. Программа работы.

7.3.1. Разделение смеси белков методом ионообменной хроматографии.

Смесь белков наносят на колонку (1,0 см на 13,5 см), заполненную ДЭАЭ-сефарозой, уравновешенную 20 ммоль/дм³ фосфатным буфером рН 6,0. Пропускают через колонку со скоростью 0,5 мл/мин в течении 30 мин тот же буфер.

Фермент элюируют линейным градиентом NaCl от 0 до 1 моль/дм³ в течении 2 часов со скоростью 0,5 мл/мин. Собирают фракции элюата по 1,0 мл. Оптическую плотность фракций фиксируют с помощью УФ-датчика при длине волны 280 нм. Фракции, содержащие белок определяют из графика (рисунок 9.1) зависимости оптической плотности от времени (номера фракции). Соответствующие каждому пику фракции объединяют и далее используют для идентификации белка (по активности) спектрофотометрическим методом.

По полученной хроматограмме рассчитывают высоту (h) и площадь (S) пиков. Для расчета площади находят произведение высоты пика на его полуширину. Рассчитать процентное соотношение белков в смеси методом нормировки по площади пиков.

$$X(\%) = \frac{100 \times S_1}{S_1 + S_2}$$

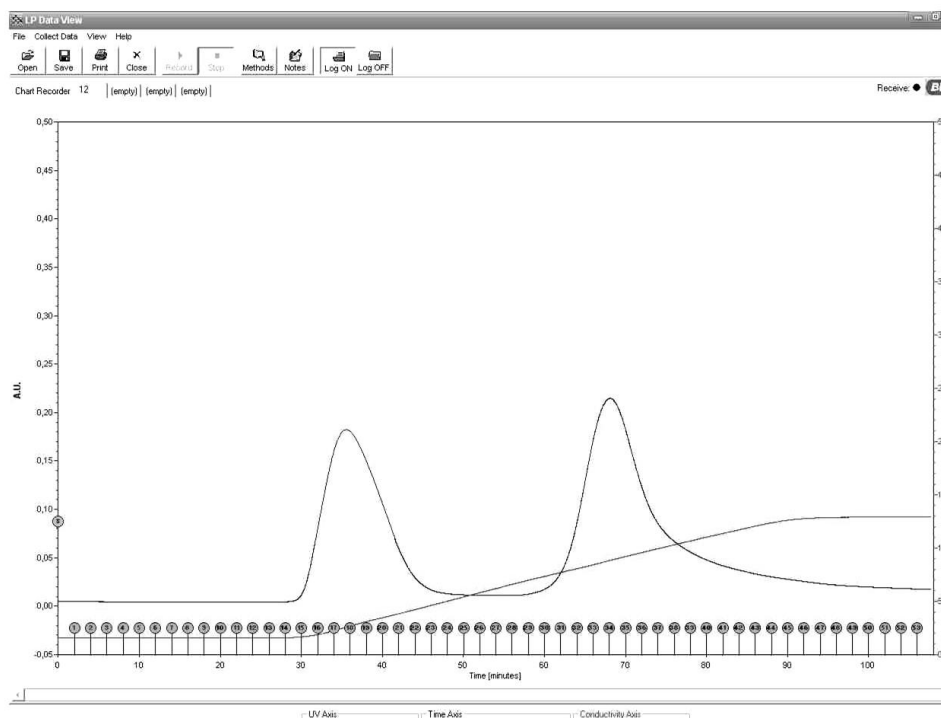


Рисунок 7.1. Разделение смеси пероксидазы хрена и глюкозооксидазы методом ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-сефарозе.

7.3.2. Идентификация ферментов в полученных фракциях.

В соответствующие кюветы поместить следующие объемы реактивов:

	Измерительная кювета	Кювета сравнения
Реактив С	1700 мкл	1700 мкл
Реактив D	1500 мкл	1500 мкл
Реактив E	10 мкл	10 мкл

Перемешать содержимое каждой кюветы и дождаться пока оптическая плотность перестанет изменяться. Затем добавить:

	Измерительная кювета	Кювета сравнения
Дистиллированная вода	-	10 мкл
Отобранная фракция	10 мкл	-

Перемешать и регистрировать оптическую плотность при длине волны 460 нм 10 минут (рисунок 9.2).

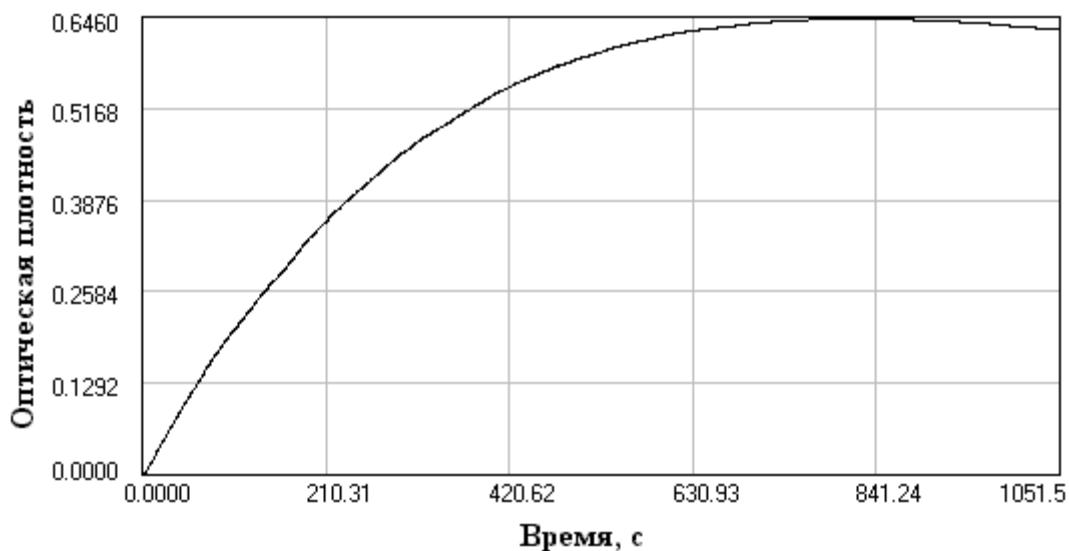


Рисунок 7.2. Зависимость оптической плотности реакционной смеси при ферментативном окислении глюкозы в присутствии о-дианизидина от времени реакции. (фермент глюкозооксидаза, концентрация глюкозы 100 мкг/мл).

Если оптическая плотность реакционной смеси возрастает, значит, в исследуемой фракции присутствует фермент глюкозооксидаза. Вторая фракция содержит пероксидазу хрена.

Лабораторная работа № 8. Обессоливание белкового раствора методом эксклюзионной хроматографии

Введение

Низкомолекулярные вещества из белкового раствора можно удалить достаточно быстро и полно с помощью эксклюзионной хроматографии (гель-фильтрации). Разделение веществ этим методом основано на различии в размерах молекул. Крупные молекулы не проникают в поры гранул геля и выходят из колонки в первую очередь, в то время как небольшие молекулы попадают через поры в гранулы, вследствие этого задерживаются на колонке и движутся с меньшей скоростью (рисунок 8.1.). Метод гель-фильтрации часто называют разделением веществ по принципу молекулярного сита.

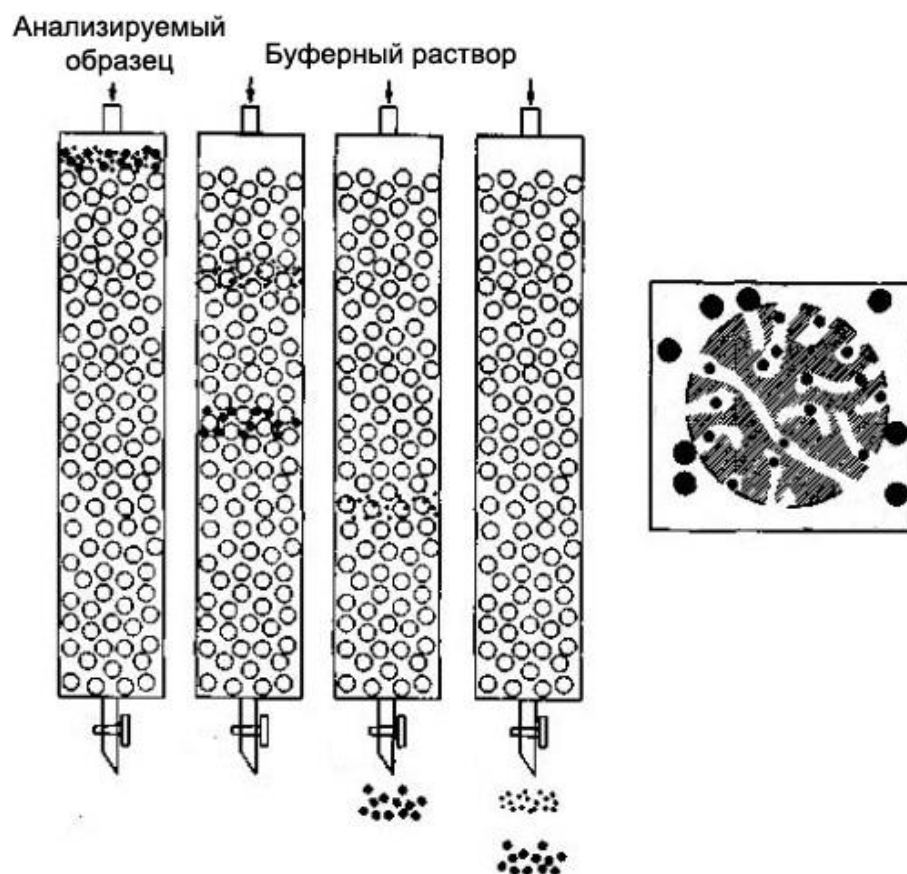


Рисунок 8.1. Принцип действия метода гель-фильтрации.

Поведение молекул в колонке при гель-фильтрации может быть описано следующим уравнением:

$$K_{\text{ср}} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad (8.1)$$

где V_t — общий объем колонки, V_0 — свободный объем (между гранулами геля), V_e — объем элюации рассматриваемой молекулы и $K_{\text{ср}}$ — коэффициент, определяющий долю пор, которую может занимать эта молекула.

Свойствами молекулярного сита обладают многие пористые материалы. Наиболее часто для этой цели применяют органические полимеры с трехмерной сетчатой структурой. Например, гели полисахарида декстрана (коммерческое название — сефадексы). При изготовлении сефадексов полисахаридные цепи декстрана соединяются поперечными сшивками (рисунок 8.2.).

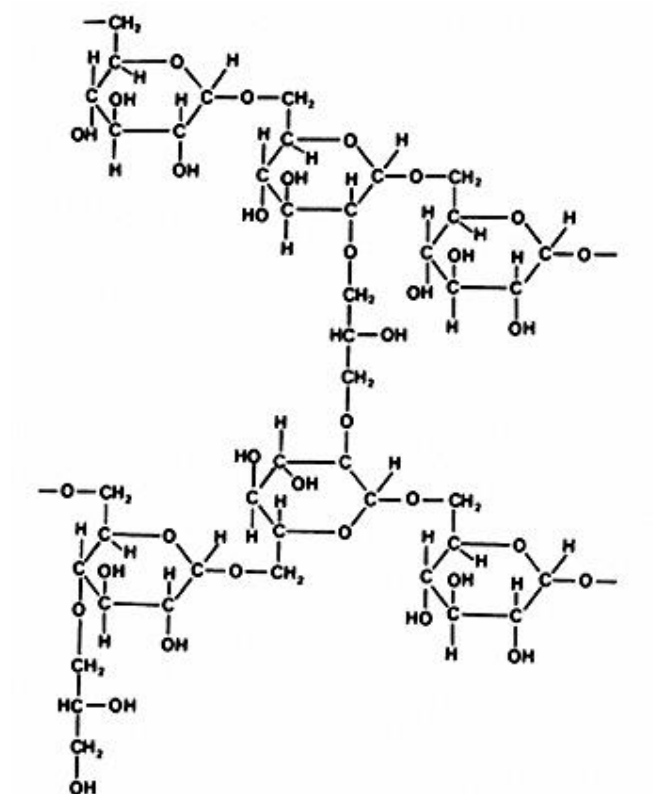


Рисунок 8.2. Химическое строение сефадексов.

Существует несколько типов сефадекса, различающихся как размером и количеством, так и величиной гранул. Это позволяет применять их для разделения веществ с разными размерами молекул. Благодаря высоко-

му содержанию гидроксильных групп гранулы сефадекса легко набухают, образуя гель. Чем выше способность геля к набуханию, тем больше номер сефадекса.

Сефадексы отличаются различной степенью сшивки молекул декстрана друг с другом. Это находит выражение в различной набухаемости гранул сефадекса и пределах эксклюзии (выражаемой значениями молекулярной массы веществ, еще способных входить внутрь гранул сефадекса), в связи с чем, и построена их классификация (таблица 8.1).

Таблица 8.1. Характеристика некоторых видов сефадексов

Марка Сефадекса	Предел эксклюзии, в единицах молекулярной массы	Поглощение воды, мл/г	Удельный объем в колонке, см ³ /г	Время полного набухания при комнатной температуре, ч	Диапазон фракционирования белков по молекулярной массе, тыс.
G-25	5000	2,5±0,2	4 – 6	3	1,0 – 5,0
G-50	10000	5,0±0,3	9 – 11	3	1,5 – 30
G-75	50000	7,5±0,5	12 – 15	24	3,0 – 75
G-100	100000	10,0±1,0	15 – 20	48	4,0 – 150
G-150	150000	15,0±0,5	20 – 30	72	5,0 – 300
G-200	200000	20,0±2,0	30 – 40	72	5,0 – 600

Для освобождения белковых растворов от солей обычно используют сефадекс марки G-25. Применение сефадексов для фракционирования сложных белковых смесей типа тех, что характерны для биологических жидкостей (сыворотка крови, гемолимфа беспозвоночных и т.п.) или экстрактов, полученных из животных и растительных тканей, малоэффективно: удастся лишь разделить смесь белков на несколько групп. Тем не менее, в ряде случаев это первая стадия при выделении индивидуальных белков. Сефадексы применяют также на заключительных этапах очистки белка от примеси сопутствующего белка, если последний достаточно резко отличается от первого по величине молекулярной массы.

В последнее время сефадексы применяют для определения молекулярной массы белков путем сопоставления величин свободного (т.е. не занятого гранулами сефадекса) и элюируемого (т.е. необходимого для выноса белка из колонки) объемов колонки.

8.1. Цель работы:

Практическое ознакомление с методом эксклюзионной хроматографии.

8.2. Объекты и средства исследования.

1. Яичный альбумин (1%-ный раствор в 0,5%-ном растворе бихромата калия).
2. Голубой декстран 1% р-р.
3. Биуретовый реактив.
4. Колонка размером 1*25 см с гелем сефадекса G-25 (4 г в 200 мл дистиллированной воды).
5. Дистиллированная вода.
6. Штативы с пробирками.
7. Пипетки.

8.3. Программа работы

8.3.1. Заполнение и подготовка колонки.

Колонку заполняют сефадексом G-25. Для этого 4 г сефадекса предварительно заливают 200 мл 0,09 М раствора хлорида натрия в стакане на 1 литр, хорошо перемешивают и оставляют на 24 часа. Через сутки набухший сефадекс промывают 5 раз 0,09 М раствором хлорида натрия путем декантации. Затем стакан с гелем сефадекса помещают в большой вакуумный эксикатор и в течение 1,5 часов деаэрируют под вакуумом, создаваемым водоструйным насосом, после чего гель готов для заполнения колонки. Заполнение гелем колонки ведут осторожно, заливая его медленно и непрерывно по стенке колонки, что предохраняет его от захвата пузырьков воздуха.

8.3.2. Определение объема водной фазы колонки V_0 .

Открывают зажим на колонке и сливают 0,1 моль/л раствор NaCl, находящийся над гелем. Зажим закрывают и на поверхность геля очень аккуратно, по стенке, с помощью пипетки наносят 0,5 мл раствора голубого декстрана. Открывают зажим и вытекающую из колонки жидкость собирают в мерный цилиндр и сохраняют до конца опыта. Наблюдают за проникновением нанесенного раствора в гель (поверхность геля не должна оставаться сухой, поэтому по мере вытекания жидкости из колонки раствор NaCl доливают в колонку либо подсоединяют к колонке склянку с раствором).

Заранее готовят пять чистых пробирок. Как только из колонки начнет вытекать окрашенный (голубой) раствор, в эти пробирки собирают окрашенные фракции, по 0,5 мл в каждую пробирку. Элюат из этих пробирок от начала ряда, включая пробирку с самой интенсивной окраской, сливают в цилиндр, где уже собраны предыдущие (неокрашенные) фракции. Объем остальных пробирок, в которых окраска начинает ослабевать, не учитывается. Таким образом, объем элюата от начала опыта до появления наиболее яркой голубой окраски составляет объем водной фазы колонки (V_0). Закончив определение, колонку отмывают от следов голубого декстрана.

8.3.3. Обессоливание белкового раствора методом гель-фильтрации.

Перед нанесением раствора белка открывают кран и наблюдают за уменьшением столбика воды над слоем сефадекса. Как только над поверхностью геля останется слой жидкости толщиной 1-2 мм, кран закрывают и аккуратно пипеткой наносят на гель 0,5 мл раствора белка, в который предварительно добавляют 5 мг $K_2Cr_2O_7$. Кран открывают и следят за проникновением раствора в гель. По мере вытекания жидкости из колонки в

колонку доливают раствор NaCl либо подсоединяют к колонке склянку с раствором

В 12 микропробирок отмеривают 0,5 мл биуретового реактива. Собирают фракции с колонок по 20 капель (1 мл) в пробирки, содержащие биуретовый реактив. Далее собирают по 1 мл элюата в пустые пробирки, до исчезновения оранжевого окрашивания. При этом не забывают добавлять в колонку раствор NaCl. Наблюдают за изменением окраски в порциях элюата.

Гель в колонке отмывают водой до полного удаления $K_2Cr_2O_7$.

При оформлении работы описывают принцип метода и результаты заносят в таблицу 8.2.

Таблица 8.2. Результаты опыта по обессоливанию раствора белка.

В элюата, мл	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	...
Белок													
$K_2Cr_2O_7$													

Отмечают при каком объеме элюата из колонки выходит белок и $K_2Cr_2O_7$.

Лабораторная работа № 9. Разделение смеси ферроценов методом тонкослойной хроматографии.

Введение

Тонкослойная хроматография занимает особое место среди других хроматографических методов благодаря простоте методики и доступности оборудования, широкой области применения, экономичности, достаточно высокой селективности и чувствительности.

Неподвижная фаза тонким слоем (100-300 мкм) наносится на стеклянную, металлическую или пластмассовую пластины. В качестве сорбента чаще всего используют силикагель, оксид алюминия, целлюлозу, полиамид, кизельгур. На линию старта (1,5-2 см от края пластины) очень малым пятном наносятся анализируемая смесь и стандартные вещества. Для этого используют капилляры, специальные микропипетки или микрошприцы. Затем пластину помещают в герметичную камеру с растворителем, который выполняет роль подвижной фазы. Под действием капиллярных сил растворитель движется вдоль слоя сорбента до финиша и с разной скоростью переносит компоненты смеси, что приводит к их разделению. Принцип разделения – неодинаковое сродство разделяемых органических веществ к подвижной жидкой фазе и стационарному сорбенту. После достижения растворителем (элюентом) линии финиша пластину высушивают и проводят идентификацию компонентов.

Важной характеристикой степени разделения определяемых соединений является величина коэффициента удерживания:

$$R_f = \frac{x_1}{L} \quad (9.1)$$

R_f – отношение расстояния от центра пятна на пластине до линии старта (x) к расстоянию, пройденному растворителем от линии старта до финиша (L) (рисунок 9.1.). Величина R_f является характеристикой природы

определяемого соединения и зависит от используемых сорбента и растворителя. В случае высокоэффективной тонкослойной хроматографии за счет создания принудительного движения подвижной фазы с регулируемой скоростью, уменьшения размера частиц сорбента до 5-7 мкм и насыщения пространства над пластиной парами растворителя удастся существенно ускорить процесс и повысить четкость разделения.

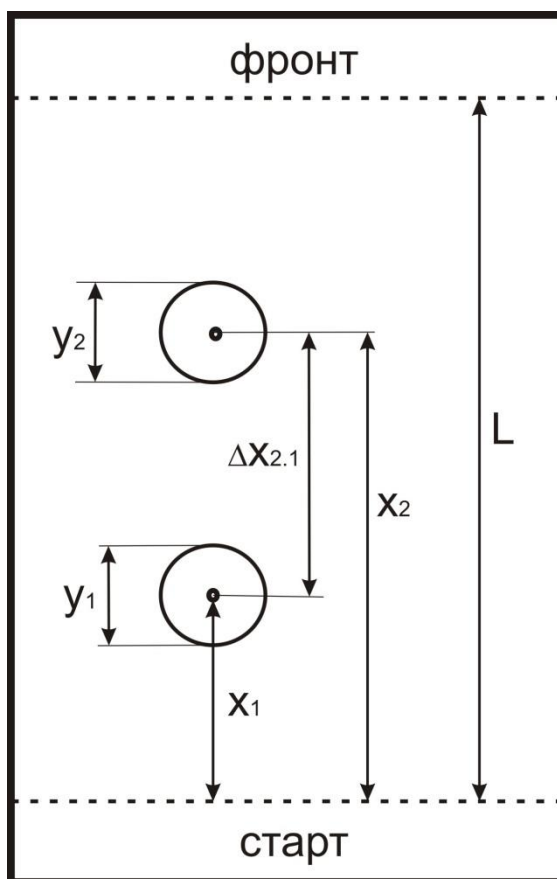


Рисунок 9.1. Схема анализа методом ТСХ.

Мерой эффективности разделения на бумаге или в тонком слое, как и в колоночной хроматографии, является величина разрешения R_s . Критерий разделения определяют исходя из хроматограммы по формуле:

$$R_s = \frac{2\Delta x_{2,1}}{y_1 + y_2} \quad (9.2)$$

Количественный анализ осуществляют непосредственно на хроматограмме или после вымывания анализируемого вещества из слоя сорбента. Для анализа используют спектрофотометрию, флуориметрию, ИК-

спектроскопию, радиометрические и др. методы. Для рутинных количественных определений используют денситометры, которые измеряют интенсивность поглощения электромагнитного излучения при сканировании хроматографической пластинки.

Во многих случаях для определения содержания веществ на пластинках ТСХ используют полуколичественный метод. Он заключается в визуальном сравнении размера пятна (а также сопоставлении интенсивностей) с размерами серии пятен этого же вещества с известными концентрациями. Несмотря на простоту подхода, он обеспечивает правильность определения 5-10% при содержании 1-5 мкг.

9.1. Цель работы:

Проведение разделения смеси ацетилферроцен – ферроцен, определение параметров разделения указанных веществ.

9.2. Объекты и средства исследования.

1. Водный раствор ацетилферроцена,
2. Водный раствор ферроцена,
3. Хлороформ х.ч.,
4. Гексан х.ч.,
5. Бензол х.ч.,
6. Пластины СилуфолF₂₅₄,
7. Стеклянные пластины,
8. Хроматографическая камера.

9.3. Программа работы.

Подготовить пластины к работе: разогнать пластины чистым растворителем по всей высоте, просушить в течение 5 мин при нагревании.

Приготовить растворитель: смешать хлороформ:гексан в соотношении 1:2 в объеме 24 мл. Поместить растворитель в хроматографическую камеру. Герметично закрыть камеру, оставить на 10-15 мин для насыщения. С помощью капилляра нанести на пластину раствор свидетеля (фер-

роцен) и определяемую смесь как показано на рисунке 9.2. Раствор наносят очень малым пятном.

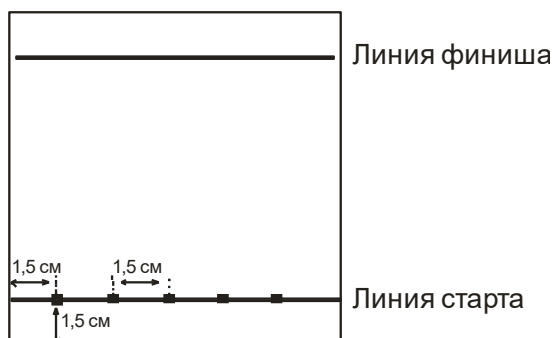


Рисунок 9.2. Схема нанесения анализируемых растворов на пластину ТСХ.

Поместить пластину в хроматографическую камеру с подвижным растворителем. По достижении растворителем линии финиша вынуть пластину из камеры, высушить на воздухе до удаления паров растворителя. Отметить окрашенные участки. Рассчитать величину коэффициента удерживания ферроцена и ацетилферроцена, определить разрешение.

Аналогично провести разделение смеси ферроцена и ацетилферроцена с использованием растворителя бензола. Рассчитать значения R_f , R_s , сделать вывод о влиянии полярности растворителя на данные параметры.

Лабораторная работа № 10. Определение содержания анионов в воде методом капиллярного электрофореза

Введение

Одним из самых современных и перспективных методов на сегодняшний день является капиллярный электрофорез (КЭ), вобравший в себя все лучшие качества хроматографических методов и электрофореза. В этом методе разделение смеси заряженных или нейтральных молекул основано на различии в их электрофоретической подвижности и (или) распределении между раствором и движущимися в электрическом поле заряженными частицами (мицеллами, коллоидными частицами, металлокомплексами, молекулами полиэлектrolита).

При анализе методом капиллярного электрофореза пробу небольшого объема (несколько нанолитров) вводят на анодном конце в кварцевый капилляр, заполненный ведущим электролитом (например, фосфатные и боратные буферные растворы с концентрациями 10-100 мМ, растворы органических и неорганических солей, кислот и оснований). К тонкому кварцевому капилляру (внутренний диаметр 25-100 мкм) длиной 20-100 см прикладывают напряжение от 10 до 30 кВ.

Под действием электрического поля компоненты пробы начинают двигаться по капилляру с разной скоростью, зависящей от их структуры, заряда и молекулярной массы, и соответственно, в разное время достигают детектора. Полученная последовательность пиков называется электрофореграммой, при этом качественной характеристикой вещества является параметр удерживания (время миграции), а количественной – высота или площадь пика, пропорциональная концентрации вещества.

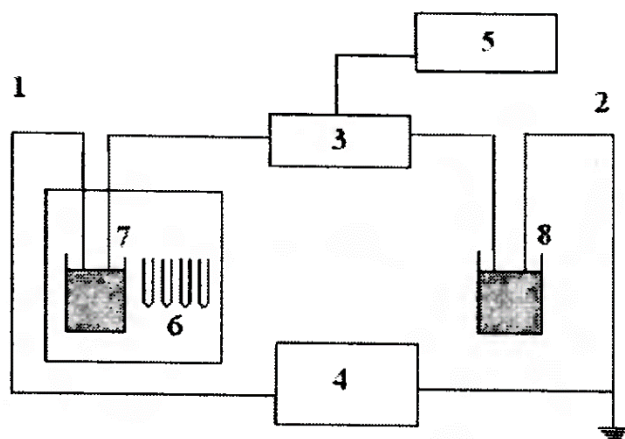


Рисунок 10.1. Схема установки капиллярного электрофореза: 1 – анодная зона, вход капилляра; 2 – катодная зона, выход капилляра; 3 – детектор; 4 – источник высокого напряжения; 5 – регистрирующее устройство; 6 – контейнеры для проб; 7, 8 – сосуды с буферным раствором.

На заряженную частицу в простейшем случае действуют две противоположно направленные силы – электростатического притяжения и сопротивления движению частицы. В равновесных условиях действие этих сил уравнивает друг друга, и скорость миграции частицы определяется выражением:

$$\mu = \frac{q \times E}{6 \times \pi \times \eta \times r} \quad (10.1)$$

где q – заряд иона, а E – напряженность электрического поля. η – вязкость среды, r – радиус частицы.

Электрофоретическая подвижность $\mu_{\text{эф}}$ определяется как скорость движения частицы, деленная на напряженность электрического поля:

$$\mu_{\text{эф}} = \frac{V_{\text{эф}}}{E} \quad (10.2)$$

где, $V_{\text{эф}}$ – скорость идеализированной сферической частицы.

При проведении разделения в капиллярах особенно важное значение приобретает электроосмотический поток (ЭОП), связанный с движением диффузной части двойного слоя, образующегося относительно заряженной

поверхности внутренней стенки капилляра. Результирующая подвижность частиц μ определяется суммой электрофоретической и электроосмотической подвижностей:

$$\mu = \mu_{\text{эф}} + \mu_{\text{эо}} \quad (10.3).$$

Это дает определенные преимущества при анализе смесей противоположно заряженных ионов, поскольку все определяемые компоненты будут двигаться в направлении детектора вследствие ЭОП. Однако скорость передвижения ионов с одинаковым направлением электрофоретической и электроосмотической подвижностей будет увеличиваться, а противоположным – уменьшаться. Для немодифицированного кварцевого капилляра в диффузной части двойного электрического слоя присутствует некоторая избыточная концентрация катионов, в результате движения которых возникает ЭОП, направленный к катоду. В результате катионы будут перемещаться быстрее и детектироваться до ЭОП, а анионы медленнее и детектироваться после ЭОП, нейтральные молекулы движутся с ЭОП.

Для повышения воспроизводимости КЭ в присутствии ЭОП, электроосмотический поток должен быть постоянным в течение всех проводимых определений, а сохранение постоянства ЭОП часто требует значительных усилий по подготовке до и после работы. В кварцевых капиллярах ЭОП уменьшается при увеличении концентрации электролита и добавлении органических растворителей и возрастает с увеличением pH, а также зависит от вязкости раствора в капилляре и температуры. Если же при добавлении катионных поверхностно-активных веществ (ПАВ) к разделительному буферу на поверхности капилляра адсорбируется положительный заряд, то ЭОП меняет направление и переносит разделительный буфер в направлении анода.

10.1. Цель работы:

Измерений массовых концентраций хлорид-ионов, нитрит-ионов, сульфат-ионов, нитрат-ионов, фторид-ионов и фосфат-ионов в воде методом капиллярного электрофореза.

10.2. Объекты и средства исследования.

1. Система капиллярного электрофореза «Капель» с отрицательной полярностью источника высокого напряжения (внутренний диаметр капилляра 75 мкм, полная длина капилляра 60 см, эффективная длина 50 см), оснащенная специализированным программным обеспечением на основе персонального компьютера.

2. Весы лабораторные специального класса точности с ценой наименьшего деления не более 0,1 мг, наибольшим пределом взвешивания не более 210 г

3. Колбы мерные 2-100-2, 2-50-2, 2-25-2

4. Пипетки градуированные 2-го класса

5. Микродозаторы с переменным объемом 10-100 мм³, 100 –1000 мм³, 1000-5000 мм³ и пределом допускаемой погрешности измерения не более 2 %

6. рН-метр лабораторный

7. Центрифуга лабораторная с частотой вращения не менее 5000 оборотов в минуту

8. Пробирки одноразовые (типа Эппендорф) вместимостью 1,5 см³

9. Государственные стандартные образцы состава растворов анионов

10. Вода дистиллированная

11. Хрома (VI) оксид, ч.д.а

12. Цетилтриметиламмония гидроксид (гексадецилтриметиламмония гидроксид) (ЦТА-ОН)

13. Диэтаноламин
14. Гидроксид натрия, х.ч.
15. Соляная кислота, х.ч.

10.3. Программа работы.

10.3.1. Приготовление растворов.

Все растворы готовят на свежей дистиллированной воде, соответствующей ГОСТ 6709-72.

Раствор гидроксида натрия для промывки капилляра.

В стакан из термостойкого стекла помещают 2 г гидроксида натрия и растворяют в 100 см³ дистиллированной воды. Срок хранения в сосуде из полиэтилена - 6 месяцев. Молярная концентрация раствора приблизительно 0,5 моль/дм³.

Раствор соляной кислоты для промывки капилляра.

В стакан из термостойкого стекла помещают 100 см³ дистиллированной воды, затем приливают 8 см³ концентрированной соляной кислоты и перемешивают. Срок хранения не ограничен. Молярная концентрация приготовленного раствора приблизительно равна 1 моль/дм³.

Раствор оксида хрома (VI), молярная концентрация 0,05 моль/дм³.

В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают навеску 0,500 г оксида хрома (VI), растворяют в 50 - 60 см³ дистиллированной воды, затем доводят до метки дистиллированной водой. Срок хранения раствора в стеклянной емкости с притертой пробкой или плотно закрытом полиэтиленовом сосуде не ограничен.

Раствор диэтанолamina(ДЭА), молярная концентрация 0,10 моль/дм³.

В мерную колбу вместимостью 25 см³ помещают 0,263 г диэтанолamina, предварительно замороженного до кристаллического состояния, растворяют в дистиллированной воде и доводят до метки дистиллированной

водой. Срок хранения раствора в полиэтиленовой посуде в условиях, исключающих поглощение углекислого газа из воздуха – 1 месяц.

Раствор цетилтриметиламмония гидроксида (ЦТА-ОН), молярная концентрация 0,010 моль/дм³.

В мерную колбу вместимостью 25 см³, содержащую 4-5 см³ дистиллированной воды, помещают 0,75 см³ 10%-ного раствора ЦТА-ОН. По окончании растворения объем раствора в колбе доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают. Срок хранения в пластиковой посуде в условиях, исключающих поглощение углекислого газа из воздуха при температуре 4 °С – 6 месяцев.

Хроматный буферный раствор (ведущий электролит).

В чистый сухой стакан вместимостью 50 см³ помещают 2,0 см³ раствора оксида хрома (VI), 3,0 см³ ДЭА, и 3,0 см³ дистиллированной воды. Тщательно перемешивают, а затем добавляют 2,0 см³ ЦТА-ОН. Сразу после смешения раствор фильтруют через мембранный фильтр, используя медицинский шприц, в пластиковую посуду с закрывающейся крышкой. Ведущий электролит содержит 10 ммоль/дм³ хромата, 30 ммоль/дм³ ДЭА и 2 ммоль/дм³ ЦТА-ОН. Раствор хранят при комнатной температуре и используют в течение 1 недели.

10.3.2. Подготовка капилляра к работе.

Капилляр перед работой рекомендуется промыть по следующей схеме:

- 3 минуты дистиллированной водой;
- 5 минут раствором гидроксида натрия;
- 5 минут - дистиллированной водой;
- 10 минут – раствором ведущего электролита;

Все промывочные растворы собирают в сливную пробирку, не погружая в нее выходной конец капилляра.

В конце рабочего дня капилляр промывают дистиллированной водой 10 минут и оставляют на ночь в воде.

10.3.3. Градуировка системы капиллярного электрофореза.

Перед градуировкой необходимо проанализировать холостой раствор, в качестве которого служит дистиллированная вода, использованная для приготовления вспомогательных растворов и градуировочной смеси №1. Приготовление градуировочных смесей №№ 2-4 проводят только после проверки чистоты дистиллированной воды.

Приготовление градуировочной смеси № 1

В мерную колбу вместимостью 50 см³ помещают по 1 см³ растворов ГСО состава раствора хлорид- и сульфат-ионов, по 2,5 см³ растворов ГСО состава нитрит-, нитрат-, фосфат-ионов и 0,5 см³ раствора ГСО состава раствора фторид-ионов, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают. Массовая концентрация хлорид- и сульфат-ионов в смеси составляет 200 мг/дм³, нитрат- и нитрит-ионов 50 мг/дм³, фосфат-ионов 25 мг/дм³ и фторид-ионов 10 мг/дм³. Срок хранения приготовленного раствора – 1 месяц.

Приготовление градуировочных смесей №№ 2 - 4

Состав смесей для градуировки системы приведен в таблице 10.1.

Таблица 10.1. Состав градуировочных смесей

Анионы	Массовая концентрация, мг/дм ³			
	1	2	3	4
Хлорид-ионы	200	100	20	2
Нитрит-ионы	50	25	5	0,5
Сульфат-ионы	200	100	20	2
Нитрат-ионы	50	25	5	0,5
Фторид-ионы	10	5	1	0,1
Фосфат-ионы	25	12,5	2,5	0,25

Для приготовления градуировочной смеси № 2 в чистый сухой сосуд с плотно завинчивающейся крышкой объемом не менее 10 см³ помещают 5 см³ градуировочной смеси № 1 и 5 см³ дистиллированной воды и перемешивают. Срок хранения раствора – 2 недели. Для приготовления градуировочной смеси № 3 в мерную колбу вместимостью 25 см³ помещают 2,5 см³ градуировочной смеси № 1, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают. Срок хранения раствора – 1 неделя. Для приготовления градуировочной смеси № 4 в мерную колбу вместимостью 25 см³ помещают 2,5 см³ градуировочной смеси № 3, доводят до метки дистиллированной водой. Срок хранения раствора – 1 день.

Построение градуировочной зависимости

Для проведения градуировки системы анализируют градуировочные смеси регистрируя подве электрофореграммы каждого раствора. Рекомендуемые условия анализа представлены в таблице 10.2. В таблице 10.3 представлена схема рекомендуемой установки пробирок в карусельный барабан автосемплера.

Таблица 10.2. Условия анализа градуировочных растворов

Определяемые компоненты	Хлорид-, нитрит-, сульфат-, нитрат-, фторид-, фосфат-ионы
Модификация системы «Капель»	104, 104Т
Длина волны, нм	254
Ввод пробы	30 мбар, 10 с
Напряжение, кВ	минус 17
Температура, °С	20 °С
Ориентировочное время анализа, мин	7

Таблица 10.3.

Пример установки пробирок с растворами в карусели автосемплера

Номер пробирки	Входная карусель	Выходная карусель
1	Анализируемый раствор	
2		
3		
4		
5		
6	Раствор соляной кислоты 1 моль/дм ³	
7	Вода дистиллированная	Вода дистиллированная
8	Раствор гидроксида натрия 0,5 моль/дм ³	Сливная пробирка
9	Ведущий электролит для промывки капилляра	Ведущий электролит для промывки капилляра
10	Ведущий электролит для анализа	Ведущий электролит для анализа

Диапазон построения градуировочной зависимости составляет для хлорид- и сульфат-ионов 0,5 - 200 мг/дм³, для нитрит- и нитрат-ионов 0,2 - 50 мг/дм³, для фосфат - ионов 0,25 – 25 мг/дм³ и для фторид-ионов 0,1 - 10 мг/дм³.

В таблице 10.4 представлена программа анализа для модификаций при использовании рекомендованных параметров и схемы установки пробирок в автосемплере.

Таблица 10.4.Пример программы анализа для модификаций «Капель-104/104Т»

Номер шага	Код операции	Условия	Содержание шага
1	4	№9	Установка на входе пробирки с рабочим буфером для промывки
2	7	№3	Установка на выходе пробирки для слива в опущенном состоянии
3	1	180 с	Промывка капилляра ведущим электролитом перед анализом
4	5	№10	Установка на выходе в рабочую позицию пробирки №10 с рабочим буферным раствором
5	4	№1	Установка на входе в рабочую позицию пробирки №1 с анализируемым раствором
6	2	30 мбар, 10 с	Ввод пробы
7	4	№10	Установка на входе в рабочую позицию пробирки №10 с рабочим буферным раствором
8	3	0 мбар, минус 17 кВ, 7 мин	Установка параметров и времени окончания анализа
9	4	№9	Установка на входе пробирки с рабочим буфером для промывки
10	7	№3	Установка на выходе пробирки для слива в опущенном состоянии
11	1	180 с	Промывка капилляра ведущим электролитом после анализа
12	5	№9	Установка пробирки с буферным раствором на выходном конце капилляра в поднятом положении

Непосредственно перед анализом все растворы дегазируют центрифугированием (скорость вращения 5000 об/мин, время 5 мин). Пример электрофореграммы градуировочного раствора приведен на рисунке 10.2.

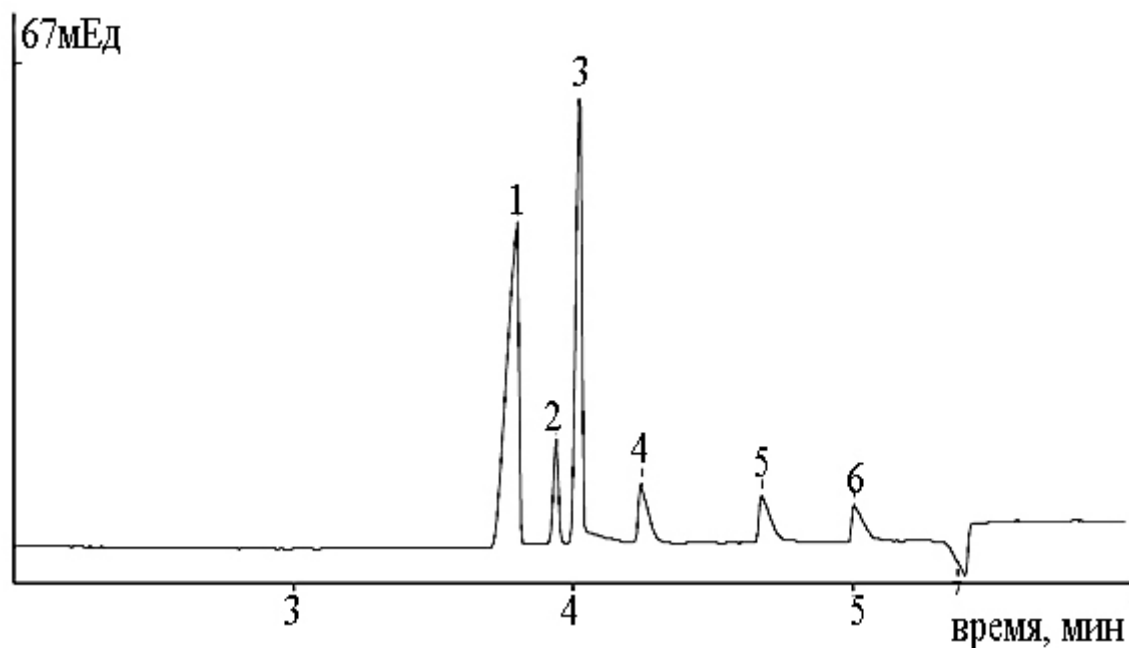


Рисунок 10.2. Пример электрофореграммы градуировочного раствора №2. 1 – хлорид, 2 – нитрит, 3 – сульфат, 4 – нитрат, 5 – фторид, 6 – фосфат, 7 – гидрокарбонат.

На полученных электрофореграммах проверяют правильность автоматической разметки пиков и, если необходимо, корректируют ее, удаляют лишние пики. При использовании ПО «МультиХром» рекомендуется устанавливать следующие параметры сглаживания:

- выбросы – включено;
- медиана – 2;
- гауссиана – 3.

Необходимо применять одинаковые параметры сглаживания для данных, полученных при построении градуировочной характеристики и при анализе проб. Фильтрация шумов изменяет исходные данные, поэтому не рекомендуется использовать без необходимости большие значения медианы и гауссианы.

Далее обрабатывают электрофореграммы согласно процедуре градуировки в соответствии с Руководством пользователя программного обес-

печения «МультиХром» или другого программного обеспечения, используемого для сбора и обработки данных.

Проверяют приемлемость полученной градуировочной характеристики. Градуировочная характеристика признается приемлемой при выполнении следующих условий:

- коэффициент корреляции, рассчитанный программой, превышает 0,99;
- при использовании ПО «МультиХром» значение относительного СКО не превышает 5%.

В противном случае находят и устраняют причины неудовлетворительных результатов, после чего градуировку системы повторяют.

10.3.4.Выполнение измерений.

Работу с пробами необходимо начинать после проведения градуировки системы или после проверки стабильности градуировочной характеристики.

Подготовка пробы к анализу

Анализируемую пробу (не менее 100 см³) фильтруют через сухой фильтр «синяя лента» в сухую посуду, обязательно отбрасывая первые 25 см³ фильтрата. Проверяют pH пробы при помощи универсальной индикаторной бумаги. Если значение pH пробы находится в диапазоне от 5 до 9, то ее анализируют далее.

Измерение массовой концентрации анионов

В сухую одноразовую пробирку типа Эппендорф с помощью пипеточного дозатора помещают 0,5 – 1,0 см³ подготовленной пробы, центрифугируют в течение 5 минут при 5000 об/мин и анализируют в условиях, указанных в таблице 10.2. Регистрируют не менее двух электрофореграмм подготовленной пробы. По окончании анализа проверяют правильность автоматической разметки пиков, удаляют лишние пики. Используя программное обеспечение, проводят идентификацию компонентов в пробе по

совпадению времен миграции компонентов в пробе и контрольной смеси при ширине окна идентификации 5 %.

Если анализируемые компоненты обнаружены, то определяют их массовую концентрацию с использованием градуировочной зависимости. Если измеренные значения массовой концентрации одного или нескольких компонентов превышают верхний предел диапазона линейности градуировочной характеристики, то необходимо дополнительно разбавить анализируемый раствор дистиллированной водой так, чтобы массовая концентрация компонента в разбавленной пробе находилась в середине этого диапазона, и повторить анализ. Коэффициент разбавления Q в этом случае вычисляют по формуле:

$$Q = V_k / V_a, \quad (10.4)$$

где V_k - объем колбы, см^3 ; V_a - объем аликвоты пробы, см^3 .

10.3.5. Обработка результатов измерений.

С помощью программного обеспечения формируют отчет с указанием массовой концентрации определяемых компонентов, выраженной в мг/дм^3 . Если разбавление пробы не было учтено программно, то массовую концентрацию компонентов в пробе вычисляют по формуле:

$$X = X_{\text{изм}} \times Q \quad (10.5)$$

где X – массовая концентрация компонентов в пробе, мг/дм^3 ;

$X_{\text{изм}}$ – среднее арифметическое измеренных значений массовой концентрации соответствующего компонента, мг/дм^3 ;

Q - коэффициент разбавления пробы.

Результат измерения должен быть представлен в виде: $X \pm \Delta$, мг/дм^3 , $P = 0,95$, где X - результат измерений, мг/дм^3 , Δ - показатель точности методики, мг/дм^3 :

$$\Delta = 0,01 \times \delta \times X \quad (10.6)$$

Значение δ для каждого компонента приведено в таблице 10.5.

Таблица 10.5. Диапазон измерений и значения показателя точности методики

Диапазон измерений, мг/дм ³	Показатель точности методики $\pm \Delta$, %
Хлорид-ионы	
от 0,5 до 5,0 вкл.	24
свыше 5,0 до 20000 вкл.	10
Сульфат-ионы	
от 0,5 до 5,0 вкл.	20
свыше 5,0 до 20000 вкл.	10
Нитрат- и нитрит-ионы	
от 0,2 до 0,5 вкл.	28
свыше 0,5 до 5,0 вкл.	20
свыше 5,0 до 100,0 вкл.	10
Фосфат-ионы	
от 0,25 до 2,0 вкл.	20
свыше 2,0 до 100,0 вкл.	10
Фторид-ионы	
от 0,1 до 0,5 вкл.	18
свыше 0,5 до 1,0 вкл.	14
свыше 1,0 до 25,0 вкл.	10

Лабораторная работа № 11. Определение содержания катионов в воде методом капиллярного электрофореза

Введение

Для определения катионов используют источник высокого напряжения положительной полярности. Это так называемая классическая схема, которая подразумевает, что детектор находится вблизи катода и ЭОП движется от анода к катоду. В этом случае катионы будут двигаться к катоду в том же направлении, что и ЭОП, но быстрее него.

Чтобы зарегистрировать пики катионов, применяют косвенное детектирование: в состав ведущего электролита вводят поглощающий катион бензимидазола (БИА) в концентрации 0,01 М, которая обеспечивает необходимую оптическую плотность исходного раствора. При разделении катионы пробы эквивалентно замещают в растворе катион бензимидазолия, что приводит к снижению оптической плотности в зоне каждого катионного компонента.

Бензимидазол в водном растворе является слабым основанием, ($pK_a = 5,8$). Это означает, что при $pH\ 5,8$ в растворе в равных концентрациях находятся молекулярная и катионная формы бензимидазола, а при $pH\ 4,8$ концентрация катионной формы в 10 раз превышает концентрацию формы молекулярной. Так как для эквивалентного обмена катионов необходимо, чтобы концентрация катионной формы БИА в электролите была как можно больше, электролит должен быть слабокислым. Однако в таком случае резко уменьшается скорость ЭОП, а также возрастает общая концентрация электролита, что приводит к возрастанию тока в капилляре. Ведущий электролит готовят на основе винной кислоты, анионы которой обладают малой подвижностью и, следовательно, увеличивают сопротивление электролита, а соотношение кислоты и основания подбирают так, чтобы был достигнут необходимый компромисс между временем анализа и величиной тока.

При электрофорезе катионы регистрируются в последовательности, которая определяется их электрофоретической подвижностью. Первыми мигрируют пики аммония и калия. Их электрофоретические подвижности одинаковы, поэтому без специальных мер они выходят одним общим пиком. Для разделения аммония и калия в состав ведущего электролита вводят специальную добавку 18-краун-6, являющегося макроциклом с гидрофильной внутренней полостью, размер которой очень близок размеру ионного радиуса иона калия. В результате образуются комплексы включения по типу «гость»—«хозяин», где «гостем» являются катионы калия, а «хозяином» — молекулы краун-эфира, в основе такого комплексообразования лежат ион-дипольные взаимодействия катиона калия с атомами кислорода (рисунок 11.1). Благодаря образованию комплекса включения подвижность ионов калия снижается, а подвижность других ионов остается без изменений.

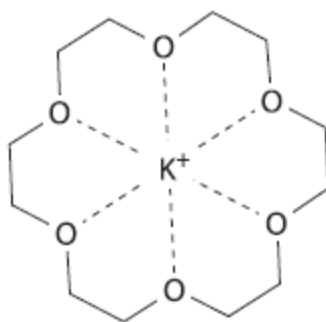


Рисунок 11.1 Графическая формула комплекса катиона калия с 18-краун-6

При высоких концентрациях магния, литий может попадать на «хвост» пика магния, это существенно затрудняет разметку и приводит к ошибкам в количественных расчетах. Для устранения данного эффекта в составе буферного раствора увеличивают концентрацию винной кислоты, которая уже при низких концентрациях образует с двухвалентными катионами в слабокислой среде однозарядные комплексные катионы. Их подвижности существенно отличаются от подвижностей свободных двухза-

рядных катионов, благодаря чему щелочно-земельные катионы выходят после лития. Наиболее резко изменяется поведение кальция, который в отсутствие винной кислоты выходит между натрием и литием первым из двухвалентных катионов, а в ее присутствии выходит последним после пика бария.

11.1. Цель работы:

Измерение массовых концентраций катионов аммония, калия, натрия, лития, магния, стронция, бария и кальция в воде методом капиллярного электрофореза.

11.2. Объекты и средства исследования.

1. Система капиллярного электрофореза «Капель» с отрицательной полярностью источника высокого напряжения (внутренний диаметр капилляра 75 мкм, полная длина капилляра 60 см, эффективная длина 50 см), оснащенная специализированным программным обеспечением на основе персонального компьютера

2. Весы лабораторные специального класса точности с ценой наименьшего деления не более 0,1 мг, наибольшим пределом взвешивания не более 210 г

3. Колбы мерные объемом 25, 50 и 100 см³

4. Пипетки градуированные 2-го класса

5. Микродозаторы с переменным объемом 10-100 мм³, 100 –1000 мм³, 1000-5000 мм³ и пределом допускаемой погрешности измерения не более 2 %

6. рН-метр лабораторный

7. Центрифуга лабораторная с частотой вращения не менее 5000 оборотов в минуту

8. Пробирки одноразовые (типа Эппендорф) вместимостью 1,5 см³

9. Государственные стандартные образцы состава растворов катионов

10. Вода дистиллированная

11. Винная кислота, безводная, ч.д.а.

12. Бензимидазол, ч.

13. 18-Краун-6, импортный

14. Гидроксид натрия, х.ч.

15. Соляная кислота, х.ч.

11.3. Программа работы.

11.3.1. Приготовление растворов

Все растворы готовят на свежей дистиллированной воде, соответствующей ГОСТ 6709-72.

Раствор гидроксида натрия для промывки капилляра.

В стакан из термостойкого стекла помещают 0,4 г гидроксида натрия и растворяют в 100 см³ дистиллированной воды. Срок хранения в сосуде из полиэтилена - 6 месяцев. Молярная концентрация раствора приблизительно 0,1 моль/дм³.

Раствор соляной кислоты для промывки капилляра.

В стакан из термостойкого стекла помещают 100 см³ дистиллированной воды, затем приливают 8 см³ концентрированной соляной кислоты и перемешивают. Срок хранения не ограничен. Молярная концентрация приготовленного раствора приблизительно равна 1 моль/дм³.

Раствор смеси бензимидазола и винной кислоты, молярная концентрация 40 ммоль/дм³ и 10 ммоль/дм³, соответственно.

В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают навеску 0,472 г бензимидазола и 0,15 г винной кислоты, добавляют приблизительно 50 см³ воды, выдерживают на кипящей водяной бане до полного растворения. Охлаждают раствор до комнатной температуры, затем доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают. Приготовленный

раствор содержит 40 ммоль/дм³ бензимидазола и 10 ммоль/дм³ винной кислоты. Срок хранения раствора - 6 месяцев.

Раствор 18-крауна-6, молярная концентрация 10 ммоль/дм³

В мерную колбу вместимостью 50 см³ помещают 0,132 г 18крауна-6, растворяют в дистиллированной воде и разбавляют дистиллированной водой до метки. Срок хранения раствора в холодильнике - 6 месяцев. Исходный реактив 18-краун-6 необходимо хранить в холодильнике.

Рабочий буферный раствор (ведущий электролит)

В сухом сосуде смешивают 5,0 см³ раствора смеси бензимидазола и винной кислоты, 2,0 см³ раствора 18-крауна-6 и 3,0 см³ дистиллированной воды. Сразу после смешивания раствор фильтруют через целлюлозно-ацетатный фильтр в сухой сосуд с завинчивающейся крышкой. Приготовленный раствор содержит 20 ммоль/дм³ бензимидазола, 5 ммоль/дм³ винной кислоты и 2,0 ммоль/дм³ 18-крауна-6. Срок хранения раствора - 1 неделя.

11.3.2. Подготовка капилляра к работе.

Капилляр перед работой рекомендуется промыть по следующей схеме:

- 3 минуты дистиллированной водой;
- 5 минут раствором гидроксида натрия;
- 5 минут - дистиллированной водой;
- 10 минут – раствором ведущего электролита;

Все промывочные растворы собирают в сливную пробирку, не погружая в нее выходной конец капилляра. В конце рабочего дня капилляр промывают дистиллированной водой 10 минут и оставляют на ночь в воде.

11.3.3. Градуировка системы капиллярного электрофореза.

Готовят градуировочные растворы.

Раствор смеси ионов лития массовой концентрации 40 мг/дм³ и бария массовой концентрации 200 мг/дм³.

В мерную колбу вместимостью 25 см³ помещают 1,0 см³ раствора ГСО состава раствора ионов лития и 5,0 см³ раствора ГСО состава раствора ионов бария, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают. Срок хранения раствора в холодильнике - 3 месяца. Следует обращать внимание на то, что при приготовлении раствора смеси ионов лития и бария недопустимо выпадение осадка, свидетельствующего о наличии сульфат-ионов в составе ГСО лития. В этом случае необходимо использовать стандартный образец, не содержащий сульфат-ионов.

Градуировочный раствор №1

В мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают по 5,0 см³ ГСО состава раствора ионов аммония, калия, натрия, кальция, 2,5 см³ ГСО состава раствора ионов магния и стронция, 5,0 см³ раствора смеси ионов лития и бария, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают. Срок хранения раствора в холодильнике - 3 месяца.

Градуировочный раствор №2

В мерную колбу вместимостью 50 см³ помещают 5,0 см³ градуировочного раствора №1, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают. Срок хранения раствора в холодильнике - 3 недели.

Градуировочный раствор №3

В мерную колбу вместимостью 50 см³ помещают 5,0 см³ градуировочного раствора №2, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают. Срок хранения раствора в холодильнике - 1 неделя.

Значения массовой концентрации компонентов в градуировочных растворах приведены в таблице 11.1.

Таблица 11.1. Состав градуировочных растворов

Катион	Массовая концентрация, мг/дм ³		
	Градуировочные растворы		
	1	2	3

Аммоний	50	5	0,5
Калий	50	5	0,5
Натрий	50	5	0,5
Литий	2	0,2	0,02
Магний	25	2,5	0,25
Стронций	25	2,5	0,25
Барий	10	1	0,1
Кальций	50	5	0,5

Построение градуировочной зависимости

Перед построением градуировочных зависимостей необходимо проанализировать холостой раствор, в качестве которого служит дистиллированная вода, использованная для приготовления вспомогательных и градуировочных растворов. После подготовки капилляра к работе регистрируют по одной электрофореграмме градуировочного раствора №3 и дистиллированной воды в условиях, указанных в таблице 11.1.

На электрофореграмме смеси №3 должны фиксироваться минимум шесть пиков (без лития и бария), максимум восемь. Если на электрофореграмме не наблюдаются пики минорных компонентов (лития или бария), то чувствительности прибора недостаточно для регистрации этих пиков по используемой схеме анализа.

Качество дистиллированной воды признается удовлетворительным, если:

- на электрофореграмме дистиллированной воды не наблюдается положительных пиков примесей, совпадающих по времени миграции с определяемыми ионами,
- на электрофореграмме дистиллированной воды наблюдаются положительные пики примесей, совпадающие по времени миграции с

определяемыми ионами и их высоты не превышают 20% от высот соответствующих пиков градуировочного раствора №3.

Если высоты пиков примесей в холостой пробе составляют более 20 % от высот соответствующих пиков для градуировочного раствора №3, необходимо найти и устранить причину плохого качества дистиллированной воды или использовать бидистиллированную или деионизированную воду.

Для проведения градуировки системы анализируют каждый из градуировочных растворов, регистрируя по две электрофореграммы каждого раствора в условиях выбранной схемы анализа согласно таблице 11.2.

Таблица 11.2. Условия анализа градуировочных растворов

Определяемые компоненты	аммоний, калий, натрий, литий, магний, стронций, барий и кальций
Модификация системы «Капель»	104, 104T
Длина волны, нм	254
Ввод пробы	30 мбар, 5 с
Напряжение, кВ	25
Температура, °C	20°C
Ориентировочное время анализа, мин	7

В таблице 11.3 представлена схема рекомендуемой установки пробирок в карусельный барабан автосемплера.

Таблица 11.3. Пример установки пробирок с растворами в карусели автосемплера

Номер пробирки	Входная карусель	Выходная карусель
1	Анализируемый раствор	

2		
3		
4		
5		
6	Раствор соляной кислоты 1 моль/дм ³	
7	Вода дистиллированная	Вода дистиллированная
8	Раствор гидроксида натрия 0,1 моль/дм ³	Сливная пробирка
9	Ведущий электролит для промывки капилляра	Ведущий электролит для промывки капилляра
10	Ведущий электролит для анализа	Ведущий электролит для анализа

В таблице 11.4 представлена программа анализа для модификаций при использовании рекомендованных параметров и схемы установки пробирок в автосемплере.

Таблица 11.4.Пример программы анализа для модификаций «Капель-104/104Т»

Номер шага	Код операции	Условия	Содержание шага
1	4	№9	Установка на входе пробирки с рабочим буфером для промывки
2	7	№3	Установка на выходе пробирки для слива в опущенном состоянии
3	1	120 с	Промывка капилляра ведущим электролитом перед анализом
4	5	№10	Установка на выходе в рабочую позицию пробирки №10 с рабочим буферным раствором
5	4	№1	Установка на входе в рабочую позицию пробирки №1 с анализируемым раствором
6	2	30 мбар, 5 с	Ввод пробы

7	4	№10	Установка на входе в рабочую позицию пробирки №10 с рабочим буферным раствором
8	3	0 мбар, 25 кВ, 7 мин	Установка параметров и времени окончания анализа
9	4	№9	Установка на входе пробирки с рабочим буфером для промывки
10	7	№3	Установка на выходе пробирки для слива в опущенном состоянии
11	1	120 с	Промывка капилляра ведущим электролитом после анализа
12	5	№9	Установка пробирки с буферным раствором на выходном конце капилляра в поднятом положении

Непосредственно перед анализом все растворы дегазируют центрифугированием (скорость вращения 5000 об/мин, время 5 мин). Пример электрофореграммы градуировочного раствора приведен на рисунке 11.2.

На полученных электрофореграммах проверяют правильность автоматической разметки пиков и, если необходимо, корректируют ее, удаляют лишние пики. Далее электрофореграммы обрабатывают согласно процедуре градуировки, описанной в Руководстве пользователя программного обеспечения, используемого для сбора и обработки данных. При использовании ПО «МультиХром» каждая из схем анализа должна быть записана в свой метод.

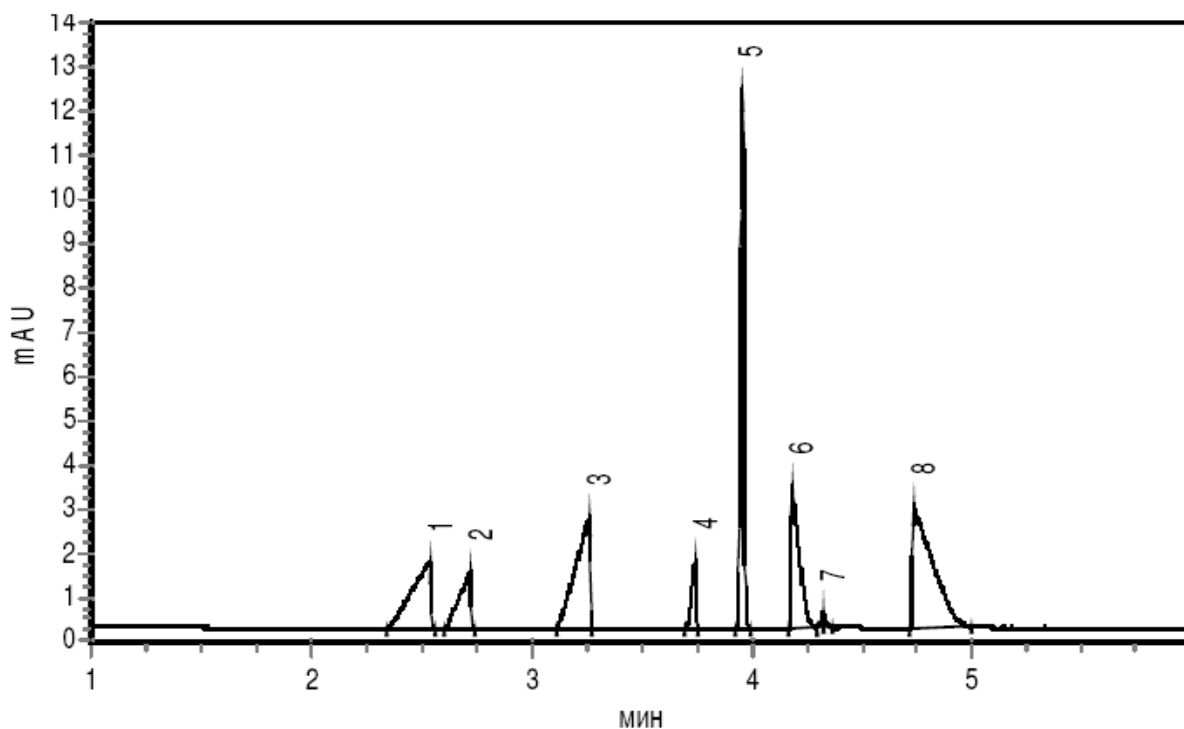


Рисунок 11.2. Пример электрофореграммы градуировочного раствора №1.1 – аммоний, 2 – калий, 3 – натрий, 4 – литий, 5 – магний, 6 – стронций, 7 – барий, 8 – кальций.

11.3.4. Выполнение измерений.

Работу с пробами необходимо начинать после проведения градуировки системы или после проверки стабильности градуировочной характеристики.

Подготовка пробы к анализу

Анализируемую пробу подготавливают по одному из вариантов:

- фильтруют в сухую посуду через фильтр «синяя лента», отбрасывая первые 5,0 см³ фильтрата;
- фильтруют в сухую посуду через целлюлозно-ацетатный фильтр (размер пор 0,2 мкм), отбрасывая первые 1,0 см³ фильтрата.

Измерение массовой концентрации катионов

В сухую одноразовую пробирку типа Эппендорф помещают 0,5 - 1,0 см³ подготовленной пробы, центрифугируют в течение 5 минут при 5000 об/мин и анализируют согласно выбранной схеме анализа в условиях, ука-

занных в таблице 11.2. Регистрируют электрофореграмму подготовленной пробы. По окончании анализа проверяют правильность автоматической разметки пиков. Используя программное обеспечение, проводят идентификацию компонентов в пробе по совпадению времен миграции компонентов в пробе и градуировочном растворе при ширине окна идентификации 5 %.

Если анализируемые компоненты обнаружены, то определяют их массовую концентрацию с использованием градуировочной характеристики. Если по результатам предварительных испытаний или определений (например, солёности, электропроводности или жесткости) известно, что анализируемые пробы имеют концентрации катионов, превышающие верхнюю границу диапазона, пробы необходимо разбавить перед анализом. Коэффициент разбавления можно учесть программно или вычислить окончательный результат вручную. Коэффициент разбавления Q в этом случае вычисляют по формуле:

$$Q = \frac{V_k}{V_a} \quad (11.1)$$

где V_k - объем колбы, см³;

V_a - объем аликвоты пробы, см³.

11.3.5. Обработка результатов измерений

С помощью программного обеспечения формируют отчет с указанием массовой концентрации определяемых компонентов, выраженной в мг/дм³. Если разбавление пробы не было учтено программно, то массовую концентрацию компонентов в пробе вычисляют по формуле:

$$X = X_{\text{изм}} \times Q \quad (11.2)$$

где X – массовая концентрация компонентов в пробе, мг/дм³;

$X_{\text{изм}}$ – среднее арифметическое измеренных значений массовой концентрации соответствующего компонента, мг/дм³;

Q - коэффициент разбавления пробы.

Результат измерения должен быть представлен в виде: $X \pm \Delta$, мг/дм³, $P = 0,95$, где X - результат измерений, мг/дм³, Δ - показатель точности методики, мг/дм³:

$$\Delta = 0,01 \times \delta \times X \quad 11.3)$$

Значение δ для каждого компонента приведено в таблице 11.5.

Таблица 11.5.

Диапазон измерений и значения показателя точности методики.

Диапазон измерений, мг/дм ³	Показатель точности методики $\pm \Delta$, %
От 0,015 до 0,05 вкл.	30
Свыше 0,05 до 0,25 вкл.	25
Свыше 0,25 до 2 вкл.	20
Свыше 2 до 10 вкл.	14
Свыше 10 до 5000 вкл.	10

Лабораторная работа № 12. Определение массовой концентрации бенз(а)пирена в воде методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Введение

Жидкостная хроматография (ЖХ) - метод разделения и анализа сложных смесей веществ, в котором подвижной фазой является жидкость. Подвижная фаза в жидкостной хроматографии выполняет двойную функцию: 1) обеспечивает перенос десорбированных молекул по колонке (подобно подвижной фазе в газовой хроматографии); 2) регулирует константы равновесия, а, следовательно, и удерживание в результате взаимодействия с неподвижной фазой (сорбируясь на поверхности) и с молекулами разделяемых веществ.

В ЖХ природа подвижной фазы имеет существенно большее значение. В результате комбинации ограниченного числа сорбентов и неограниченного числа, различных по составу, подвижных фаз возможно решение чрезвычайно большого числа встречающихся на практике задач. Метод ЖХ применим для разделения значительно более широкого круга веществ, чем газовая хроматография, поскольку большая часть веществ не обладает летучестью, а многие вещества неустойчивы при высоких температурах.

В ЖХ разделение обычно происходит при комнатной температуре. ЖХ подразделяется на варианты в соответствии с характером основных проявляющихся межмолекулярных взаимодействий: – в ситовой хроматографии разделение компонентов осуществляется за счет разницы в растворимости молекул при их прохождении (фильтрации) через слой сорбента; – в адсорбционной хроматографии – за счет разницы в адсорбируемости молекул, проходящих через слой частиц сорбента, покрытых неподвижной фазой в виде тонкого слоя или поверхностнопривитых радикальных групп; – в ионообменной и ионной хроматографии – за счет разницы в способности к обмену ионами с ионообменниками; Для анализа объектов окружа-

ющей среды наиболее широко используют ВЭЖХ в адсорбционном варианте.

В лабораторной работе представлена методика измерений массовой концентрации бенз(а)пирена в пробах природных (поверхностных, подземных и морских), питьевых (в том числе расфасованных в емкости) и сточных вод методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием жидкостного хроматографа «Люмахром» с флуориметрическим спектрофлуориметрическим детектором или хроматографической приставки ВЭЖХ-3 с анализатором жидкости «Флюорат-02» в качестве флуориметрического детектора.

Бенз(а)пирен (3,4-бензпирен) относится к классу полиядерных ароматических углеводородов (ПАУ). Структурная формула молекулы представлена ниже.

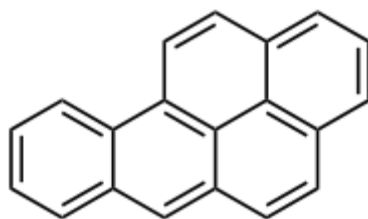


Рисунок 12.1 Структурная формула молекулы Бенз(а)пирена

Вещество является продуктом неполного сгорания (пиролиза) органических соединений и обладает канцерогенной активностью. В водных матрицах находится как в растворенном состоянии, так и в адсорбированном на взвешенных частицах виде. При хранении проб происходит значительная адсорбция бенз(а)пирена на взвесах и стенках сосуда; при этом содержание бенз(а)пирена в пробе может уменьшаться за счет микробиологической активности.

В таблице 12.1 приведены нормируемые значения ПДК бенз(а)пирена в различных типах вод. Диапазон измеряемых значений массовой концентрации бенз(а)пирена в пробах природных и питьевых вод

составляет $0,5 - 500 \text{ нг/дм}^3$, или $0,0005 - 0,5 \text{ мкг/дм}^3$, в пробах сточных вод $2 - 500 \text{ нг/дм}^3$, или $0,002 - 0,5 \text{ мкг/дм}^3$.

Таблица 12.1 Предельно допустимые концентрации (ПДК) бенз(а)пирена в природных и питьевых водах

Объекты анализа	ПДК бенз(а)пирена, мкг/дм ³	Нормативный документ
Водные объекты хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования	0,01	ГН 2.1.5.2280-07
Питьевая вода, расфасованная в емкости	Первая категория 0,005	СанПиН 2.1.4.1116-02
	Высшая категория 0,001	

12.1. Цель работы:

Определение массовой концентрации бенз(а)пирена в образцах сточных.

12.2. Объекты и средства исследования.

- 1) Жидкостный хроматограф «Люмахром» с флуориметрическим или спектрофлуориметрическим детектором
- 2) Анализатор жидкости «Флюорат-02-2М» («Флюорат-02-Панорама») с хроматографической приставкой ВЭЖХ-3
- 3) Весы лабораторные высокого класса точности с ценой наименьшего деления не более 0,01 г, наибольшим пределом взвешивания не более 210г
- 4) Колбы мерные 2-го класса точности объемом 25, 50, 100 см³
- 5) Пипетки градуированные 2-го класса точности объемом 1 и 5 см³ и/или дозаторы пипеточные с переменным объемом 50-200 мм³ и 100-

1000 мм³ с пределом допускаемой погрешности измерения не более $\pm 2\%$

6) Цилиндры мерные объемом 10, 50, 100, 200 и 1000 см³

7) Государственный стандартный образец ГСО состава раствора бенз(а)пирена в ацетонитриле номинального значения массовой концентрации 100 мкг/см³ и погрешностью аттестованного значения не более $\pm 2\%$

Средства измерения должны быть поверены в установленные сроки. Допускается использование других средств измерения и стандартных образцов, имеющих аналогичные или лучшие характеристики.

8) Хроматографическая колонка спредколонкой, заполненные обращенно-фазовым сорбентом

9) Испаритель роторный пленочный любого типа или иное устройство для удаления растворителя (например, комплект для удаления растворителя производства ГК «Люмэкс»)

10) Холодильник бытовой любого типа

11) Воронки делительные вместимостью 1 или 2 дм³

12) Колбы остродонные или грушевидные для упаривания объемом 50 или 100 см³ НШ № 29

13) Вials с завинчивающейся крышкой вместимостью 1- 5 см³

14) Баня водяная с подогревом

15) Устройство для перемешивания проб любого типа

16) Колбы плоскодонные вместимостью 100 и 250 см³ с пришлифованной пробкой

17) Воронки химические диаметром 25, 50 и 100 мм Стаканы химические вместимостью 50 и 100 см³

18) Колонка хроматографическая стеклянная с пришлифованной пробкой (внутренний диаметр 10 мм, длина 20 см)

19) Эксикатор, заполненный осушителем например, хлористым кальцием

20) Насос лабораторный вакуумный (мембранный или водоструйный), обеспечивающий разрежение 7 - 10 кПа (50-75 мм рт.ст.) с вакуумными шлангами и краном регулировки вакуума Муфельная печь или электропечь сопротивления, обеспечивающая поддержание температурного режима от 150 до 600⁰С с погрешностью $\pm 25^0\text{C}$

21) Вата медицинская

22) Фильтры бумажные «красная лента»

23) Ацетонитрил для жидкостной хроматографии, ос.ч.

24) Вода дистиллированная

25) Тиосульфат натрия, ч.д.а.

26) Кислота серная, ч.

27) Хлористый метилен, ч.д.а., перегнанный

28) Гексан, х.ч.

29) Натрий сернокислый безводный, х.ч.

30) Оксид алюминия для хроматографии, фракция 50 – 150 мкм

31) Кислота соляная, х.ч.

32) Натрий хлористый, х.ч.

33) Программное обеспечение для сбора и обработки хроматографических данных на основе персонального компьютера («Мульти-Хром» или «ПикЭксперт»)

12.3. Программа работы.

Схема анализа основана на экстракции бенз(а)пирена из проб воды гексаном или хлористым метиленом, концентрировании экстракта, при необходимости очистке его методом колоночной хроматографии, и определении бенз(а)пирена методом ВЭЖХ с использованием флуориметрического детектирования. Схема распространяется на все типы вод.

12.1. Подготовка к выполнению измерений

Перед выполнением измерений должны быть проведены следующие работы: отбор проб, подготовка стеклянной посуды, приготовление растворов, проверка и градуировка хроматографа, проверка чистоты реактивов, подготовка стеклянной хроматографической колонки (только при необходимости дополнительной очистки экстракта), подготовка пробы к анализу.

12.3.1.1. Отбор проб воды

Отбор проб производится в посуду из темного стекла. **Посуду нельзя ополаскивать пробой перед отбором!** Пробу анализируют только целиком. Объем отбираемых проб питьевых и природных вод составляет от 0,8 до 1,0 дм³. Объем проб сточной воды может варьироваться от 0,25 дм³ до 1,0 дм³ в зависимости от ожидаемого содержания бенз(а)пирена и по результатам предыдущих определений. Рекомендуемый объем отбираемой пробы 0,5 дм³. Пробы могут храниться в темноте в течение 24 ч при температуре в холодильнике.

12.3.1.2. Подготовка стеклянной посуды

Посуду для приготовления и хранения элюента моют только серной кислотой (без применения других моющих средств) и ополаскивают дистиллированной водой и ацетонитрилом.

Остальную стеклянную посуду моют горячей водой с моющим средством, тщательно ополаскивают дистиллированной водой и сушат при температуре 105⁰С.

Стеклянную посуду, использовавшуюся для анализа проб сточных вод с высоким содержанием бенз(а)пирена, не рекомендуется применять для анализа проб питьевых и чистых природных вод.

Покрытые смазкой краны и шлифы новых делительных воронок тщательно отмывают техническим хлороформом, затем гексаном, обрабатывают концентрированной серной кислотой, ополаскивают водой и затем

дают высохнуть на воздухе.

12.3.2. Приготовление реактивов и растворов

12.3.2.1 Подвижная фаза (далее - ПФ, элюент): смесь ацетонитрил - вода в объемном соотношении 4:1

Тщательно вымытый цилиндр вместимостью 1000 см^3 ополаскивают примерно 20 см^3 ацетонитрила и помещают в него 200 см^3 дистиллированной воды. Доводят объём смеси до 1000 см^3 ацетонитрилом, раствор переливают в заранее подготовленную стеклянную плотно закрывающуюся емкость для постоянного хранения и тщательно в ней перемешивают. Недопустимо использование резиновых и корковых пробок.

Перед употреблением элюент выдерживают для дегазации не менее 4 часов. Срок хранения в условиях, исключающих испарение компонентов смеси, не ограничен.

12.3.2.2. Растворы бенз(а)пирена заданной концентрации

Растворы бенз(а)пирена должны храниться в холодильнике в темноте в герметичной посуде, исключающей возможность испарения растворителя и контакт раствора с материалами иными, чем стекло и фторопласт. Растворы каждой концентрации готовят по потребности.

- Раствор бенз(а)пирена номинального значения массовой концентрации 1 мкг/см^3 .

$0,5\text{ см}^3$ ГСО состава раствора бенз(а)пирена в ацетонитриле номинального значения массовой концентрации 100 мкг/см^3 (действительное значение массовой концентрации указано в паспорте) помещают в мерную колбу вместимостью 50 см^3 , разбавляют до метки ацетонитрилом и перемешивают. Срок хранения в указанных условиях - 1 год.

Действительное значение массовой концентрации раствора ($C_i, \text{мкг/см}^3$) вычисляют по формуле

$$C_i = \frac{C_{\text{исх}} * V_{\text{исх}}}{V_i} \quad (12.1)$$

где $C_{\text{исх}}$ - массовая концентрация стандартного образца или раствора бенз(а)пирена, использованного для приготовления раствора, мкг/см^3 ;

$V_{\text{исх}}$ - объем исходного раствора бенз(а)пирена, использованного для приготовления раствора, см^3 ;

V_i - объем приготовленного раствора, см^3 .

- Раствор бенз(а)пирена массовой концентрации 50 нг/см^3 (номинальное значение)

$2,5 \text{ см}^3$ раствора бенз(а)пирена массовой концентрации 1 мкг/см^3 помещают в мерную колбу объемом 50 см^3 , доводят до метки ацетонитрилом и перемешивают. Срок хранения раствора – 6 месяцев.

Действительное значение массовой концентрации раствора ($C_i, \text{мкг/см}^3$) вычисляют по формуле (12.1)

12.3.2.3. Градуировочные растворы бенз(а)пирена в подвижной фазе

- Раствор бенз(а)пирена номинального значения массовой концентрации 50 нг/см^3

$2,5 \text{ см}^3$ раствора бенз(а)пирена номинального значения массовой концентрации 1 мкг/см^3 помещают в мерную колбу вместимостью 50 см^3 , разбавляют до метки подвижной фазой и перемешивают. Действительное значение массовой концентрации раствора вычисляют по формуле (12.1). Срок хранения - 6 месяцев.

- Раствор бенз(а)пирена номинального значения массовой

концентрации 10 нг/см^3

5 см^3 раствора бенз(а)пирена номинального значения массовой концентрации 50 нг/см^3 помещают в мерную колбу вместимостью 25 см^3 , разбавляют до метки подвижной фазой и перемешивают. Действительное значение массовой концентрации раствора вычисляют по формуле (12.1).
Срок хранения - 3 месяца.

- Раствор бенз(а)пирена номинального значения массовой концентрации 2 нг/см^3

1 см^3 раствора бенз(а)пирена номинального значения массовой концентрации 50 нг/см^3 помещают в мерную колбу вместимостью 25 см^3 , разбавляют до метки подвижной фазой и перемешивают. Действительное значение массовой концентрации раствора вычисляют по формуле (12.1).
Срок хранения - 1 неделя.

12.3.2 Подготовка хроматографа к работе

Подготовку хроматографа к работе проводят в соответствии с Руководством по эксплуатации жидкостного хроматографа «Люма-хром» или руководством по сборке и подготовке к работе ВЭЖХ-комплекса, а также с Руководством по эксплуатации флуориметрического (спектрофлуориметрического) детектора.

12.3.2.1 Условия проведения хроматографического анализа:

Условия хроматографического разделения:

- хроматографическая колонка для ВЭЖХ, заполненная обращенно-фазовым сорбентом, в условиях анализа имеющая эффективность не менее 4000 теоретических тарелок по пику бенз(а)пирена, например колонка производства группы компаний «Люмэкс» длиной 100 мм, внутренним диаметром 2,1 мм, заполненная сорбентом Кромасил С18 зернением 5 мкм;
- предколонка внутренним диаметром 2,1 мм, заполненная об-

рационно-фазовым сорбентом;

- подвижная фаза: смесь ацетонитрил – вода (4:1);
- объемная скорость подачи ПФ 200 мм³/мин;
- петлевой кран-дозатор (инжектор) с объемом петли от 10 до 20 мм³;
- флуориметрический (спектрофлуориметрический) детектор;
- при наличии термостата колонок устанавливается температура 25 ° С;
- минимально определяемое значение массовой концентрации бенз(а)пирена в растворе (соотношение сигнал/шум, равное трем), должна быть не более 1 нг/см³.

Приведенная конфигурация и параметры могут быть изменены в зависимости от используемого оборудования.

14.3.2.2. Рабочие параметры и режим работы флуориметрического/спектрофлуориметрического детектора

14.3.2.2.1. Флуориметрический детектор Люмахром ФЛД 2410«Флюорат-02-2М»

При выполнении всех измерений в канале возбуждения используют светофильтр «292», а в канале регистрации - светофильтр «ХЗ». Рекомендуемые параметры и режимы работы (см. также Руководство по эксплуатации) приведены в таблице 14.2.

При использовании системы сбора и обработки данных на основе персонального компьютера необходимые настройки производят в соответствии с руководством пользователя программного обеспечения (например, ПО «МультиХром»).

Таблица 12.2

Режим	Хроматография	
Регистрация	Время, мин.	60
	Сглаживание	10
Параметры	Чувствительность	Средняя
	Коррекция опорн.	Нет
	Коррекция проп.	Есть

12.3.3 Краткий алгоритм проведения хроматографических измерений

При подготовке и проведении измерений необходимо:

- проверить правильность сборки гидравлической схемы хроматографа в соответствии с Руководством по эксплуатации хроматографа «Люмахром» или Руководством по сборке и подготовке к работе ВЭЖХ-комплекса на основе насоса высокого давления «Питон» и анализатора жидкости типа «Флюорат-02»;
- подготовить насос к работе в соответствии с его руководством по эксплуатации;
- установить объемную скорость подачи ПФ 200 мм³/мин;
- запустить насос и дождаться прекращения роста давления;
- настроить регистрирующее устройство на прием хроматографических данных;
- перевести детектор в режим «Измерение» и дождаться стабилизации базовой линии, перевести детектор в режим «Ожидание»;
- промыть шприц и петлю крана-дозатора ацетонитрилом или подвижной фазой;
- заполнить петлю крана-дозатора анализируемым раствором (избегая попадания в нее пузырьков воздуха), вводя не менее 50 мм³, при

этом кран-дозатор должен находиться в положении «ПЕТЛЯ» («LOAD») (перед вводом в кран-дозатор при наличии капли на конце иглы шприца ее следует удалить фильтровальной бумагой);

- ввести пробу, для чего, не вынимая шприц, переключить кран-дозатор в положение «КОЛОНКА» («INJECT»); одно-временно запустить детектор и регистрирующее устройство;
- по окончании анализа детектор перевести в режим «Ожидание», переключить кран-дозатор в положение «ПЕТЛЯ» («LOAD») и вынуть шприц, после чего промыть узел ввода пробы и петлю крана-дозатора ацетонитрилом или подвижной фазой.

12.3.4. Градуировка хроматографа

В качестве образцов для градуировки хроматографа используют растворы бенз(а)пирена в подвижной фазе.

Диапазон построения градуировочной характеристики составляет от 2 до 50 нг/см³.

Регистрируют не менее двух хроматограмм каждого раствора, проверяют правильность автоматической разметки и, если необходимо, корректируют ее, удаляют лишние пики.

Далее проводят процедуру градуировки согласно практическим указаниям по использованию ПО «МультиХром» и определяют параметры градуировочной характеристики. Градуировку признают приемлемой, если вычисляемые программой относительное среднее квадратическое отклонение (далее - СКО) не более 5%, а коэффициент корреляции не ниже 0,99. Если хотя бы одно из этих условий не выполняется, заново регистрируют хроматограммы растворов и определяют параметры градуировочной характеристики. При использовании программного обеспечения «ПикЭксперт» используют только коэффициент корреляции.

12.4. Выполнение измерений

12.4.1 Подготовка пробы к анализу

При анализе питьевых и природных вод в качестве экстрагента используют или гексан, или хлористый метилен; для анализа сточных вод настоятельно рекомендуется использовать только хлористый метилен.

На бутылки с пробой делают отметку уровня жидкости для последующего измерения объема пробы.

Пробу воды целиком переносят в делительную воронку вместимостью 1000 или 2000 см³ и приливают 20 см³ раствора хлористого натрия

Если пробу не консервировали, то ополаскивают емкость, в которой находилась проба, 20 - 25 см³ гексана, переносят его в делительную воронку с пробой и встряхивают смесь в течение 2 мин вручную или 5 мин на механическом встряхивателе.

Если проба была законсервирована, то ополаскивание проводят второй порцией экстрагента.

После разделения слоев нижний водный слой переносят в сосуд, в котором находилась проба, а верхний слой - в коническую колбу вместимостью 200 или 250 см³. Повторяют экстракцию дважды такими же порциями гексана без добавления раствора хлористого натрия.

Экстракты объединяют. Воронку с фильтром «красная лента» заполняют осушителем (безводным сернокислым натрием) на высоту 2,5 - 3 см, предварительно промытым 10 см³ гексана, который отбрасывают. Объединенный экстракт фильтруют в емкость для удаления растворителя. Осушитель промывают 10 см³ гексана, который присоединяют к фильтрату.

Экстракт упаривают досуха в вакууме, поместив сосуд на водяную баню при 40 - 50⁰С; в случае использования хлористого метилена – при 30

- 40°C. Сухой остаток растворяют в 1 см³ подвижной фазы, тщательно отмывая стенки сосуда, и оставляют на 15 мин для полного растворения бенз(а)пирена. Для проб питьевой воды или питьевой воды, расфасованной в емкости, рекомендуется сухой остаток растворять в 0,5 см³ подвижной фазы.

12.4.2. Проведение хроматографических измерений

Регистрируют хроматограммы концентратов пробы (каждого не менее двух раз) в тех же условиях, при которых была проведена градуировка хроматографа. Идентификацию бенз(а)пирена в пробе проводят средствами программного обеспечения по совпадению времени удерживания бенз(а)пирена в реальной пробе с его временем удерживания полученном при контроле стабильности градуировочной характеристики, установив ширину окна идентификации 5 %.

Определяют содержание бенз(а)пирена в концентрате по каждой зарегистрированной хроматограмме и проверяют приемлемость полученных значений, используя неравенство (12.2).

$$\left| C_{K,1} - C_{K,2} \right| \leq 0,05 * \overline{C_K} \quad (12.2)$$

Где $C_{K,1}$ и $C_{K,2}$ - массовая концентрация бенз(а)пирена в образце для контроля по первой и второй хроматограммам соответственно, нг/см³

$\overline{C_K}$ - среднее арифметическое значений $C_{K,1}$ и $C_{K,2}$, нг/см³

Если условие (12.2) выполняется, то в качестве значения массовой концентрации бенз(а)пирена в концентрате пробы принимают среднее арифметическое полученных значений. Если условие не выполняется, находят и устраняют причины нестабильности, после чего ввод концентрата пробы повторяют.

Если массовая концентрация бенз(а)пирена в концентрате пробы превышает 50 нг/см³, то концентрат необходимо разбавить. Коэффициент

разбавления (Q) вычисляют по формуле:

$$Q = \frac{V_p}{V_a} \quad (12.3)$$

Где:

V_p -объем разбавленного концентрата пробы, см³;

V_a -объем аликвотной порции исходного концентрата пробы, взятый для разбавления, см³.

Для подтверждения правильности идентификации в случае сложных проб рекомендуется выполнить добавку раствора бенз(а)пирена к концентрату пробы. О достоверности идентификации можно судить по увеличению высоты предполагаемого пика бенз(а)пирена (и, соответственно, его массовой концентрации). Величина добавки должна составлять 50 - 150 % от найденного содержания бенз(а)пирена в концентрате пробы, кроме того, необходимо учитывать разбавление концентрата при введении добавки и для его снижения использовать более концентрированные растворы.

12.5. Обработка результатов эксперимента

Массовую концентрацию бенз(а)пирена в пробе вычисляют по формуле:

$$X = \frac{C_k * V_k * Q * 1000}{\eta * V_{np}} \quad (12.4)$$

Где:

X -массовая концентрация бенз(а)пирена в пробе, нг/дм³;

C_k – измеренное значение массовой концентрации бенз(а)пирена в концентрате пробы, нг/см³;

V_k - объем концентрата пробы, см³; V_{np} - объем пробы воды, см³;

η -коэффициент прохождения бенз(а)пирена

Q -коэффициент разбавления концентрата пробы;

1000- коэффициент согласования размерности единиц объема.

12.6. Оформление результатов измерений

Результат измерений в документах, предусматривающих его использование, может быть представлен в виде: $X \pm U$, нг/дм³,

где X -единичный результат измерений, нг/дм³;

U -значение показателя точности измерений(расширенная неопределенность измерений с коэффициентом охвата 2 для единичного результата измерений), нг/дм³:

$$U=0,01 * U_{отн} * X \quad (12.5)$$

Значение $U_{отн}$ для каждого компонента приведено в таблице 12.3.

Таблица 12.3

Диапазон измерений и значения показателей точности измерений

Диапазон измерений, нг/дм ³	Относительная расширенная неопределенность измерений при коэффициенте охвата $k=2^*$, $U_{отн.}, \%$
Природные и питьевые воды	
От 0,5 до 10 вкл.	45
Свыше 10 до 50 вкл.	30
Свыше 50 до 500 вкл.	20
Сточные воды	
От 2 до 10 вкл.	55
Свыше 10 до 50 вкл.	38
Свыше 50 до 500 вкл.	25

* доверительная вероятность $P=0,95$

Диапазон измерений и значения показателей точности измерений

Допускается результат измерений в документах, выдаваемых лабораторией, представлять в виде $X \pm U_L$, нг/дм³, при условии $U_L < U$, где U_L -

значение показателя точности измерений (расширенной неопределенности с коэффициентом охвата 2), установленное при реализации методики в лаборатории и обеспечиваемое контролем стабильности результатов измерений.

Литература

1. Основы аналитической химии. В двух книгах. Под редакцией Золотова Ю.А. М.: Высшая школа, 2002 – 361 с.
2. Основы аналитической химии. Практическое руководство. Под редакцией Золотова Ю.А. М.: Высшая школа, 2001 – 463 с.
3. Долгонос А.Н., Сенявин М.М., Волощик И.Н. Ионный обмен и ионная хроматография. М.: Наука, 1993 – 222с.
4. Фритц Дж., Гьерде Д., Поланд К.М. Ионная хроматография. М.: Мир, 1984 – 224с.
5. Шпигун О.А., Золотов Ю.А. Ионная хроматография и ее применение в анализе вод. М.: Изд-во МГУ, 1990 – 199с.
6. Шаповалова Е.Н., Пирогов А.В. Хроматографические методы анализа. Методическое пособие для специального курса. М.: Изд-во МГУ, 2007 – 204с.
7. Столяров Б.В. и др. Практическая газовая и жидкостная хроматография: Уч. пособие. С.-Пб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 1998 – 612с.
8. Сычев К.С. Практическое руководство по жидкостной хроматографии. М.: Техносфера, 2010- 272 с.
9. Отто М. Современные методы аналитической химии. В 2-х томах. Пер. снем. Под ред. Гармаша А.В. М.: Техносфера. Т.1. 2003. Т.2. 2004.
10. Рудаков О.Б. Востров И.А. Спутник хроматографиста. Воронеж: Водолей, 2004. — 528 с.
11. Яшин Я. И., Яшин Е. Я., Яшин А. Я. Газовая хроматография. М., 2009. — 528 с.
12. Столяров Б.В., Савинов И.М., Витенберг А.Г. Практическая газовая и жидкостная хроматография. С-П.: Изд-во Санкт- Петербургского университета, 2002 г. – 550 с.

13. Сова В.В., Кусайкин М.И. Методическое пособие к практическим занятиям по очистке белков. - Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 2006. - 42 с.

14. Нолтинг Б. Новейшие методы исследования биосистем. Москва.: Техносфера, 2005. -254 с.