

ОСНОВЫ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ

В двух книгах

Под редакцией
академика Ю.А.Золотова

1

Общие вопросы.
Методы разделения

*Издание второе, переработанное
и дополненное*



Москва
«Высшая школа» 2000

Рекомендовано Министерством образования
Российской Федерации в качестве учебника для студентов
химического направления и химических специальностей
высших учебных заведений

Авторы:

Т.А. Большова, Г.Д. Брыкина, А.В. Гармаш, И.Ф. Долманова,
Е.Н. Дорохова, Ю.А. Золотов, В.М. Иванов, В.И. Фадеева, О.А. Шпигун

Рецензенты: кафедра аналитической химии Казанского государственного
университета (зав. кафедрой проф. Г.К. Будников) и проф. Р.К. Чернова
(Саратовский государственный университет)

О 75 **Основы аналитической химии. В 2 кн. Кн. 1. Общие вопро-
сы. Методы разделения: Учеб. для вузов/Ю.А. Золотов,
Е.Н. Дорохова, В.И. Фадеева и др. Под ред. Ю.А. Золотова. —
2-е изд., перераб. и доп. — М.: Высш. шк., 2000. — 351 с.: ил.
ISBN 5-06-003558-1**

В первой книге освещаются методологические вопросы аналитической химии. Рассмотрена метрология химического анализа, в том числе понятие об аналитическом сигнале, статистических критериях правильности и воспроизводимости результатов анализа. Приведены теоретические основы и приемы пробоотбора и пробоподготовки. Излагаются основные положения кинетики и термодинамики, лежащие в основе методов химического анализа. Рассмотрены основные закономерности равновесий и протекания реакций: кислотно-основных, окислительно-восстановительных, комплексообразования и осаждения. Изложены общие принципы разделения и концентрирования веществ; описаны основные химические и физические методы разделения и концентрирования. Отдельная глава посвящена хроматографии. В учебнике разбираются типовые задачи и их решения. В конце глав приведены вопросы.

Первое издание — 1996 г.

Для студентов университетов, химико-технологических, педагогических и медицинских вузов.

УДК 543
ББК 24.4

ISBN 5-06-003558-1 (кн. 1)
ISBN 5-06-003560-3

© ГУП «Издательство «Высшая школа», 2000

Предисловие

Химический анализ служит средством контроля производства и качества продукции в ряде отраслей народного хозяйства — химической, нефтеперерабатывающей и фармацевтической промышленности, в металлургии и горнодобывающей индустрии. На результатах анализа в значительной степени базируется разведка полезных ископаемых. Анализ — главное средство контроля за загрязненностью окружающей среды. Выяснение химического состава почв, удобрений, кормов и сельскохозяйственной продукции важно для нормального функционирования агропромышленного комплекса. Химический анализ незаменим в медицинской диагностике, биотехнологии. От уровня химического анализа, оснащенности лабораторий методами, приборами и реактивами зависит развитие многих наук.

Научная основа химического анализа — аналитическая химия, наука, которая в течение столетий была частью, а иногда и основной частью химии. В последнее время эта наука в значительной степени изменилась, выросли ее возможности, расширились области, которые она охватывает.

При подготовке учебника коллектив авторов стремился приблизиться к современному уровню научной аналитической химии и принять во внимание относительную значимость отдельных направлений и методов для практического химического анализа. Авторы руководствовались требованием по возможности сочетать общехимическую подготовку студента, в которую существенный вклад вносит курс аналитической химии, с обучением наиболее важным методам анализа — даже если они не являются по природе своей химическими. Эта нелегкая, противоречивая задача, до конца разрешить ее не удастся.

Авторский коллектив состоит из преподавателей кафедры аналитической химии Московского университета.

Во втором издании значительно переработаны гл. 5 и 6, внесены изменения и исправления и в другие главы.

Предисловие и гл. 1 написал Ю. А. Золотов; гл. 2 — И. Ф. Долманова, раздел 2.1 — Е. Н. Дорохова; гл. 3 — И. Ф. Долманова; гл. 4 — Е. Н. Дорохова, А. В. Гармаш и И. Ф. Долманова; гл. 5 — Е. Н. Дорохова, А. В. Гармаш и В. И. Фадеева; гл. 6 — Е. Н. Дорохова, В. И. Фадеева и А. В. Гармаш, раздел 6.2 — В. И. Фадеева и В. М. Иванов; гл. 7 — В. И. Фадеева; гл. 8 — Т. А. Большова, Г. Д. Брыкина и О. А. Шпигун.

Авторы выражают признательность доценту С. Г. Дмитриенко за помощь при подготовке гл. 7. Мы благодарны также многим нашим коллегам, которые своими замечаниями помогли при работе над настоящим изданием.

Авторы

15. Объясните преимущества аморфного осадка перед кристаллическим при соосаждении микрокомпонентов.
16. Какие преимущества имеют органические коллекторы при соосаждении микрокомпонентов?
17. Обоснуйте преимущества хелатообразующих сорбентов перед ионообменными.
18. Какие виды взаимодействия существуют между веществом и сорбентом?
19. В каких условиях достигается полное электролитическое разделение веществ?
20. В каких условиях дистилляция обеспечивает полное разделение веществ, обладающих низкой термической устойчивостью?
21. Укажите различия между дистилляцией и отгонкой.
22. Укажите различия между направленной кристаллизацией и зонной плавкой.

Глава 8. Хроматографические методы

Хроматография — наиболее часто используемый аналитический метод. Новейшими хроматографическими методами можно определять газообразные, жидкие и твердые вещества с молекулярной массой от единиц до 10^6 . Это могут быть изотопы водорода, ионы металлов, синтетические полимеры, белки и др. С помощью хроматографии получена обширная информация о строении и свойствах органических соединений многих классов. Применение хроматографических методов для разделения белков оказало огромное влияние на развитие современной биохимии. Хроматографию с успехом применяют в исследовательских и клинических целях в самых разных областях биологии и медицины, в фармацевтике и криминалистике: для терапевтического мониторинга в связи с ростом нелегального употребления наркотиков, идентификации антибиотиков и отнесения их к той или иной группе антибактериальных препаратов, для определения наиболее важных классов пестицидов и для мониторинга окружающей среды. Такие достоинства как универсальность, экспрессность и чувствительность делают хроматографию важнейшим аналитическим методом. Более десяти работ (1957—1980), выполненных с применением хроматографических методов, были удостоены Нобелевских премий; среди авторов методических работ, удостоенных премий, А. Тизелиус (1948), А. Мартин и Р. Синдж (1956).

Что же такое хроматография? Хроматография — это физико-химический метод разделения веществ, основанный на распределении компонентов между двумя фазами — *неподвижной* и *подвижной*. Неподвижной (стационарной) фазой обычно служит твердое вещество (его часто 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. Последнюю обычно помещают в стеклянную (или металлическую) трубку, называемую *колоной*. В зависимости от силы взаимодействия с поверхностью сорбента (за счет адсорбции или по какому-либо еще механизму) компоненты перемещаются вдоль колонки с разной скоростью. Одни компоненты остаются в верхнем слое сорбента, другие, с меньшей степенью взаимодействия с сорбентом, оказываются в нижней части колонки, некоторые покидают колонку вместе с подвижной фазой. Таким образом компоненты разделяются.

Хроматография — гибридный аналитический метод, в котором хроматографическая колонка — часть аналитической системы, сочетающей разде-

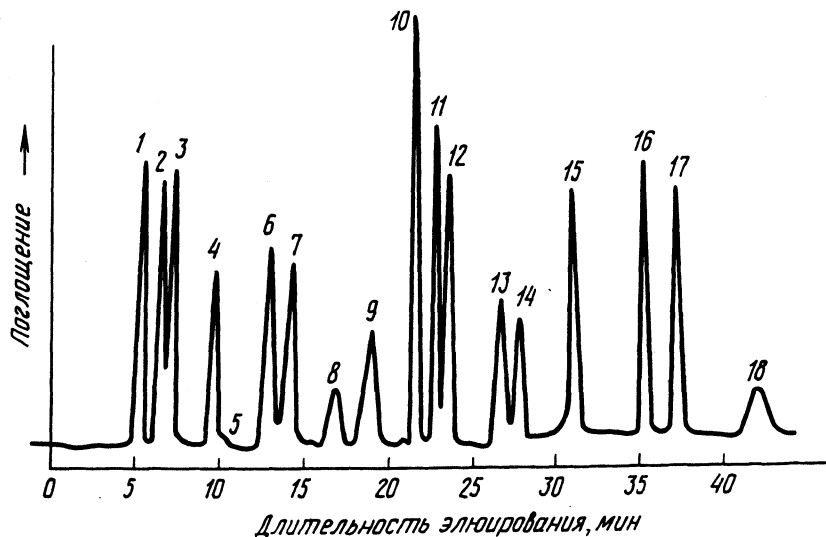


Рис. 8.1. Хроматограмма искусственной смеси аминокислот, входящих в состав продуктов гидролиза белков:

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 С-А4 (8 мкм); проба — 10 нмоль смеси; скорость потока 6–10 мл/ч, давление 83,5 атм)

ление и определение. Метод позволяет разделять многокомпонентную смесь, идентифицировать компоненты и определять ее количественный состав. Поэтому детектирование сигнала (а также запись и обработка его) занимает важное место.

В отличие от ряда других методов, основанных на распределении компонентов между фазами, хроматография — это динамический метод, обеспечивающий многократность актов сорбции—десорбции разделяемых компонентов, так как разделение происходит в потоке подвижной фазы. Этим обусловлена большая эффективность хроматографического метода по сравнению с методами сорбции и экстракции в статических условиях, поэтому хроматографическими методами возможно быстрое разделение сложных смесей, например аминокислот или редкоземельных элементов (рис. 8.1).

В 1903 г. в сообщении «О новой категории адсорбционных явлений и о применении их к биохимическому анализу» русский ученый-ботаник М. С. Цвет (1872—1919) сформулировал основы хроматографии. В более поздних работах он обосновал метод теоретически, описал разные его варианты, аппаратуру, практическое приме-

нение. Основным условием для хроматографического разделения веществ на колонке он считал различие в адсорбируемости. Расцвет и бурное развитие хроматографии начинается в 1931 г., когда появились работы по теории адсорбции и ионного обмена, были синтезированы новые органические и неорганические сорбенты. Эти работы связаны с именами Р. Куна, Е. Ледерера и А. Винтерштейна. Н. А. Измайллов и М. С. Шрайбер (1938) разработали метод тонкослойной хроматографии, А. Мартин и Р. Синдж (1941) предложили метод бумажной хроматографии. С 1940 г. развивается метод газоадсорбционной, с 1952 г. — газожидкостной хроматографии, предложенный А. Мартином и А. Джеймсом; чрезвычайно полезным оказался метод капиллярной газовой хроматографии, предложенный М. Голеем (1957). Современная высокоэффективная жидкостная хроматография начала развиваться на базе новой техники и эффективных сорбентов с 60-х годов. Х. Смол, Т. С. Стивенс и В. Бауман (1975) предложили метод ионной хроматографии. Большой вклад в развитие теории и практики хроматографии в нашей стране внесли Н. А. Шилов, М. М. Дубинин, К. В. Чмутов, А. А. Жуховицкий, Н. Н. Туркельтауб, Е. Н. Гапон, В. Г. Березкин, В. А. Даванков и др.

8.1. Классификация хроматографических методов

В основу общепринятых классификаций многочисленных хроматографических методов положены следующие признаки: агрегатное состояние подвижной и неподвижной фаз, механизм взаимодействия сорбент—сорбат, форма слоя сорбента (техника выполнения), цель хроматографирования.

По агрегатному состоянию фаз хроматографию разделяют на газовую и жидкостную. Газовая хроматография включает газожидкостную и газотвердофазную, жидкостная — жидкостно-жидкостную, жидкостно-твердофазную и жидкостно-гелевую. Первое слово в названии метода характеризует агрегатное состояние подвижной фазы, второе — неподвижной.

По механизму взаимодействия сорбента и сорбата можно выделить несколько видов хроматографии: *распределительная хроматография* основана на различии в растворимости разделяемых веществ в неподвижной фазе (газожидкостная хроматография) или на различии в растворимости веществ в подвижной и неподвижной жидких фазах; *ионообменная хроматография* — на разной способности веществ к ионному обмену; *адсорбционная хроматография* — на различии в адсорбируемости веществ твердым сорбентом; *эксклюзионная хроматография* — на различии в размерах и формах молекул разделяемых веществ, *аффинная хроматография* — на специфических взаимодействиях, характерных для некоторых биологических и биохимических процессов. Существуют пары веществ, реагирующих в растворах с высокой избирательностью, например антитело и антиген, фермент и его субстрат или ингибитор, гормон и соответствующий рецептор, и т. п. Если одно из соединений пары удерживается ковалентной связью на

носителя, то последний можно использовать для избирательного извлечения второго соединения пары.

Этим 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 устойчивости в фазе или на поверхности сорбента, и др. Следует помнить, что классификация по механизму весьма условна: ее используют в том случае, если известен доминирующий механизм; часто процесс разделения протекает сразу по нескольким механизмам.

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 и количественный анализ); *препаративную хроматографию* (для получения веществ в чистом виде, для концентрирования и выделения микропримесей); *промышленную* (производственную) хроматографию для автоматического управления процессом (при этом целевой продукт из колонки поступает в датчик). Хроматографию широко используют для исследования растворов, каталитических процессов, кинетики химических процессов и т. п.

8.2. Способы получения хроматограмм

Подвижную фазу, вводимую в слой неподвижной фазы, называют *элюентом*, а подвижную фазу, выходящую из колонки и содержащую разделенные компоненты, — *элюатом*. В элюате тем или иным способом определяют содержание компонентов. Распределение разделяемых веществ в виде отдельных полос (зон) вдоль колонки представляет собой внутреннюю хроматограмму (рис. 8.2, а). Графическое изображение (часто получаемое с помощью самописца) распределения веществ в элюате называют внешней хроматограммой, или просто хроматограммой.

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

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

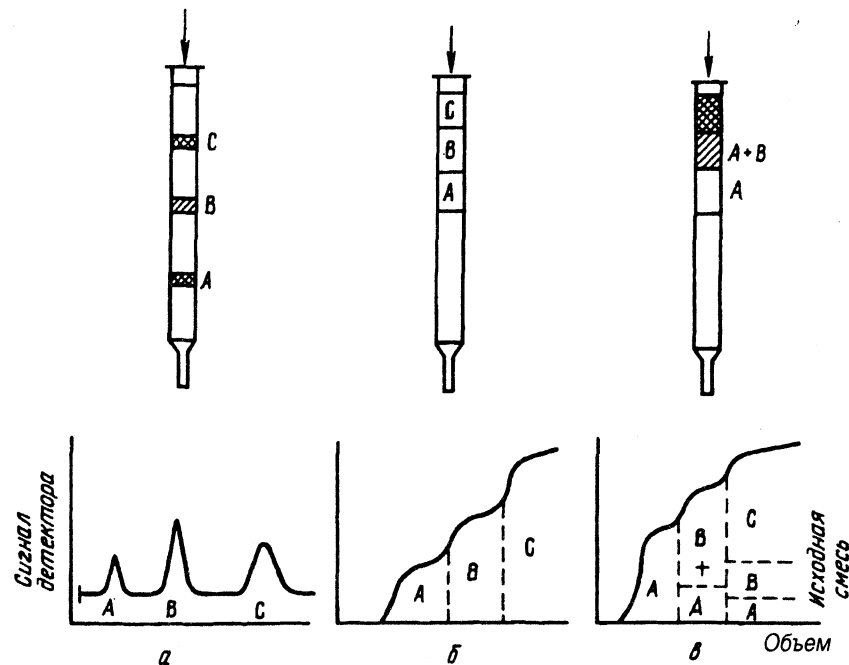


Рис. 8.2. Внутренние и внешние хроматограммы, полученные методом элюентной (а), вытеснительной (б) и фронтальной (в) хроматографии (сорбируемость веществ увеличивается в ряду $A < B < C$)

непрерывно пропускать элюент (процесс элюирования). 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 следующий компонент и т. д. В этом случае хроматограмма представляет собой несколько пиков, имеющих форму гауссовой кривой (см. рис. 8.2, а).

Самый простой вариант элюирования — *изократический*, при котором состав элюента не меняется. Его используют при разделении соединений с близким сродством к неподвижной фазе. В некоторых случаях используют *градиентное элюирование*, при котором состав элюента в процессе разделения компонентов изменяют по заданному закону. В этом случае элюирующая сила подвижной фазы возрастает, в результате чего сокращается время удерживания сильно сорбируемых веществ и улучшается разделение смеси.

В дальнейшем будем рассматривать только элюентную хроматографию как наиболее распространенную в современном хроматографическом анализе.

Кратко остановимся 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 (рис. 8.2, б). По мере продвижения по колонке элюент 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, сорбируемость которых увеличивается в ряду $A < B < C$. Из колонки сначала будет вытекать чистый растворитель, затем, когда сорбент насытится наименее сорбируемым веществом А, оно появится в элюате. Когда сорбент насытится веществом В, элюат будет содержать оба эти вещества и т. д. (рис. 8.2, в). Когда же сорбент будет полностью насыщен всеми компонентами смеси, состав элюата совпадет 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.

8.3. Хроматографические параметры

На рис. 8.3 представлена идеализированная хроматограмма смеси двух веществ. По оси абсцисс отложено время хроматографирования (можно отложить объем элюата), по оси ординат — аналитический сигнал, зависящий от концентрации веществ в элюате (отклик А). Рассмотрим основные хроматографические параметры, характеризующие поведение вещества в колонке.

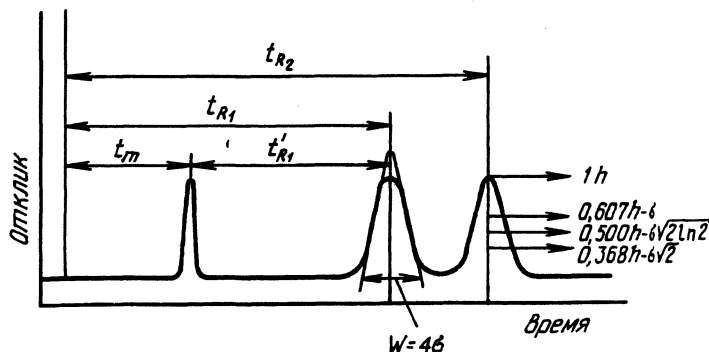


Рис. 8.3. Хроматограмма смеси двух веществ

Время от момента ввода анализируемой пробы до регистрации максимума пика называют *временем удерживания (элюирования)* t_R . Время удерживания складывается из двух составляющих — времени пребывания вещества в подвижной t_m и неподвижной t_s фазах:

$$t_R = t_m + t_s. \quad (8.1)$$

Значение t_m фактически равно времени прохождения через колонку несорбируемого компонента. 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 ввести *исправленное время удерживания* t'_R :

$$t'_R = t_R - t_m. \quad (8.2)$$

Для характеристики удерживания часто используют понятие *удерживаемого объема* V_R — объем подвижной фазы, который нужно пропустить через колонку с определенной скоростью, чтобы элюировать вещество:

$$V_R = t_R F, \quad (8.3)$$

где F — объемная скорость потока, $\text{см}^3 \cdot \text{с}^{-1}$.

Объем для вымывания несорбируемого компонента, мертвый объем, выражается через t_m : $V_m = t_m F$, и включает в себя объем колонки, не занятый сорбентом, объем коммуникаций от устройства ввода пробы до колонки и от колонки до детектора. *Исправленный удерживаемый объем* соответственно равен

$$V'_R = V_R - V_m. \quad (8.4)$$

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

Количество вещества, вымываемого из колонки, можно найти по площади под кривой элюирования:

$$m = \int_0^{\infty} c dV,$$

где c — концентрация, ммоль/мл; V — объем, мл.

Полезным параметром в хроматографии может быть коэффициент удерживания (замедления) R — отношение скорости движения вещества к скорости движения подвижной фазы:

$$R = \frac{L/t_R}{L/t_m} = \frac{t_m}{t_R},$$

где L — длина колонки. Величина R показывает, какую долю времени вещество находится в подвижной фазе. Учитывая (8.1), получаем

$$R = \frac{t_m}{t_m + t_s} = \frac{1}{1 + t_s/t_m}. \quad (8.5)$$

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

$$R = \frac{V_m}{V_R}. \quad (8.6)$$

Любой процесс распределения вещества между двумя фазами характеризуют коэффициентом распределения D (см. гл. 7). В данном случае $D = c_s/c_m$, где c_m и c_s — концентрации вещества в подвижной и неподвижной фазах соответственно. Коэффициент распределения связан с хроматографическими параметрами. Действительно, отношение времени пребывания вещества в неподвижной и подвижной фазах равно отношению количеств вещества в фазах cV :

$$\frac{t_s}{t_m} = \frac{c_s V_s}{c_m V_m} = D \frac{V_s}{V_m}. \quad (8.7)$$

Учитывая соотношение (8.5), получаем

$$R = \frac{1}{1 + D \frac{V_s}{V_m}} = \frac{V_m}{V_m + D V_s}. \quad (8.8)$$

С другой стороны, из выражения (8.6) следует

$$V_R = V_m + D V_s. \quad (8.9)$$

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

$$k' = \frac{V_R - V_m}{V_m} = \frac{V'_R}{V_m} \quad \text{или} \quad k' = \frac{t'_R}{t_m}. \quad (8.10)$$

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.

Видно, что исправленный удерживаемый объем связан с D простым соотношением:

$$V'_R = V_R - V_m = D V_s. \quad (8.11)$$

Выражения (8.9) и (8.11) — основные уравнения хроматографии, показывающие, что V'_R пропорционален величине D и объему неподвижной фазы колонки V_s . Величина V_s зависит от количества неподвижной фазы, нанесенной на единицу объема или массы сорбента, от длины и диаметра колонки. Сравнительно большие различия в значениях V_R для двух веществ А и В свидетельствуют о полном их разделении.

Если для веществ А и В $D_A = 15,0$ и $D_B = 75,0$, $V_s = 1,5$ мл, $V_m = 3,0$ мл, то можно рассчитать $V_{R(A)}$ и $V_{R(B)}$, подставляя соответствующие значения в уравнение (8.9):

$$V_{R(A)} = 15 \cdot 1,5 + 3,0 = 25,5 \text{ мл}; \quad V_{R(B)} = 75,0 \cdot 1,5 + 3,0 = 115,5 \text{ мл}.$$

Таким образом, вещество А элюируется первым, а вещество В — вторым, и, вероятно, будет происходить их полное разделение вследствие значительного различия в объемах удерживания.

8.4. Теория хроматографического разделения

При хроматографировании одновременно происходит разделение веществ и размывание хроматографических пиков разделяемых веществ, приводящее к ухудшению разделения. Остановимся на теоретических подходах, объясняющих эти два противоположных процесса хроматографии. Теория хроматографии призвана выявить причины размывания пиков и прогнозировать эффективность разделения смеси веществ.

Хроматографическое разделение определяется различной сорбцией компонентов смеси, что связано с природой сорбента и разделяемых веществ. На основании сведений по термодинамике сорбции (адсорбции, растворения или ионного обмена) можно судить о возможности разделения смеси веществ. Теоретический подход, объясняющий размывание, основан на изучении форм изотерм сорбции — графической зависимости 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) (рис. 8.4). Угол наклона изотермы определяется коэффициентом распределения

$$D = dc_s/dc_m.$$

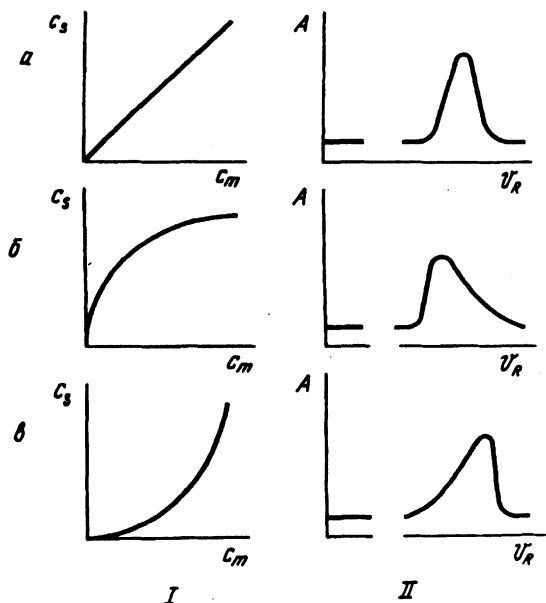


Рис. 8.4. Зависимость формы хроматографических пиков (II) от вида изотермы сорбции (I)

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

$$v = F/V_R = F/(V_m + DV_s).$$

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 свидетельствует о том, что значение D для больших концентраций вещества меньше, чем для малых, следовательно, часть зоны с большей концентрацией перемещается быстрее, чем часть зоны с малой концентрацией. В результате задняя граница хроматограммы (тыл) размывается, а пик получается несимметричным (рис. 8.4, б). При вогнутой изотерме, напротив, размытым оказывается фронт зоны, пик также несимметричен (рис. 8.4, в).

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 веществ). Однако в процессе хроматографического разделения часто происходит размывание пиков. Для объяснения специфического для хроматографии процесса размывания обычно используют теорию теоретических тарелок и кинетическую теорию.

8.4.1. 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:

$$\frac{c}{c_{\max}} = e^{\frac{-(\beta - N)^2}{2N}},$$

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 ~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. рис. 8.3). 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:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 = \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2 \quad (8.12)$$

или

$$N = 5,55 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2. \quad (8.13)$$

Определив N и зная длину колонки, легко вычислить H :

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

где L — длина колонки, см.

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 (8.12) и (8.13):

$$N = 16 \left(\frac{90,0}{12,1} \right)^2 \approx 885; \quad H = \frac{20}{885} = 2,2 \cdot 10^{-2} \text{ см.}$$

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:

$$h = \frac{H}{d_p}. \quad (8.14)$$

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 H от скорости подвижной фазы, природы и зернения сорбента, не может дать практических рекомендаций, позволяющих избежать размывания хроматографических пиков.

8.4.2. 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:

$$H = A + B/v + Cv, \quad (8.15)$$

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

$$A = 2\lambda d_p, \quad (8.16)$$

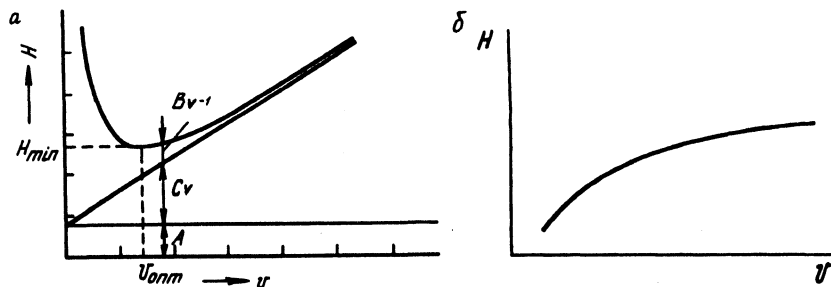


Рис. 8.5. Зависимость высоты, эквивалентной теоретической тарелке, от линейной скорости потока:

а — газовая хроматография; б — жидкостная

где λ — коэффициент гомогенности упаковки колонки; d_p — диаметр частиц сорбента. Обычно величина λ изменяется от 0,1 до 0,8. Плохая упаковка и каналообразование 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 $5d_p$). Из рис. 8.5 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

$$B = 2\gamma D_m, \quad (8.17)$$

где γ — коэффициент, учитывающий ограничение диффузии наполнителем колонки, его величина меньше 1; D_m — коэффициент диффузии хроматографируемого вещества в подвижной фазе. Эффективность колонки возрастает (H 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 $D_{ж}$ 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 H от линейной скорости потока будет

такой, как показано на рис. 8.5, б. Это связано с тем, что член B в уравнении (8.15), учитывающий продольную диффузию, в ЖХ роли не играет ($D_{ж} \ll D_r$), 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

$$Cv = \frac{8}{\pi^2} \frac{k'}{(1+k')^2} \frac{d_s^2}{D_s} v. \quad (8.18)$$

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. Если 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

$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_m}{v} + \frac{8}{\pi^2} \frac{k'}{(1+k')^2} \frac{d_s^2}{D_s} v \quad (8.19)$$

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 рис. 8.5, 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, улучшить упаковку, подбирать оптимальную линейную скорость потока (при которой H минимальна) и маловязкие неподвижные фазы (толщина их в ГЖХ должна быть небольшой).

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

$$H = A' + B'/F + C'F.$$

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

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

получают $F_{\text{опт}} = \sqrt{B'/C'}$.

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

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

и составляют два уравнения с двумя неизвестными:

$$0,0816 = B'/15 + C' \cdot 15; \quad 0,0909 = B'/40 + C' \cdot 40.$$

Отсюда

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

Тогда

$$H = 0,83/22,09 + 1,7 \cdot 10^{-3} \cdot 22,09 = 0,075 \text{ см};$$

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

8.4.3. 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 (см. разд. 8.4.1) и кинетической теории (см. разд. 8.4.2). 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 дисперсия (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):

$$H = \frac{\sigma^2}{L}, \quad (8.20)$$

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

$$N = \frac{\sigma^2}{H^2}. \quad (8.21)$$

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:

$$\sigma^2 = \sigma_1^2 + \sigma_2^2 + \dots + \sigma_n^2, \quad (8.22)$$

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 размывания. Тогда результирующее стандартное отклонение полосы $\sigma = \frac{w}{4}$ вычисляют как $\sqrt{\sum \sigma_i^2}$.

Факторы, определяющие размывание пика и записанные через слагаемые дисперсии можно выразить через величину H , комбинируя уравнения (8.20) и (8.22):

$$H = \frac{\sigma^2}{L} = \frac{\sigma_1^2}{L} + \frac{\sigma_2^2}{L} + \dots + \frac{\sigma_n^2}{L}. \quad (8.23)$$

Это позволяет наглядно представить, например, вклад каждого из механизмов кинетического размывания в ВЭТТ (см. рис. 8.5, а).

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 1. 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 $\sigma = 0,047 \text{ см}$, т. е. стандартное отклонение ширины пика лишь немного больше, чем стандартное отклонение (0,045), связанное с влиянием на размывание наиболее существенного фактора;

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.

8.4.4. 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:

$$\alpha = \frac{t'_{R_2}}{t'_{R_1}} = \frac{V'_{R_2}}{V'_{R_1}} = \frac{D_2}{D_1} = \frac{k'_2}{k'_1}. \quad (8.24)$$

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

$$R_s = \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{(w_2 + w_1)/2} = 2 \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{w_2 + w_1}, \quad (8.25)$$

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

$$R_s = \frac{\Delta t_R}{w_2} = \frac{\Delta t_R}{w_1}. \quad (8.26)$$

Как видно из уравнения (8.25), разрешение пиков зависит от их ширины и от расстояния между максимумами пиков. Учитывая уравнения (8.7), (8.21) и (8.24), приходим к выводу, что разрешение — функция эффективности N , коэффициента селективности α и емкости k' колонки:

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'}{1 + k'} \right). \quad (8.27)$$

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

$$N = 16 R_s^2 \left(\frac{k' + 1}{k'} \right)^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2. \quad (8.28)$$

На рис. 8.6 показано влияние эффективности колонки и селективности сорбента на разделение смеси двух веществ. Оптимизация разделения сводится к выбору лучшего сочетания параметров, входящих в уравнение (8.28). 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 ($R_s = 1$):

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

Как видно из рис. 8.7 (при постоянном параметре R_s), чем меньше коэффициент селективности α , тем большее число N необходимо для разделения двух веществ.

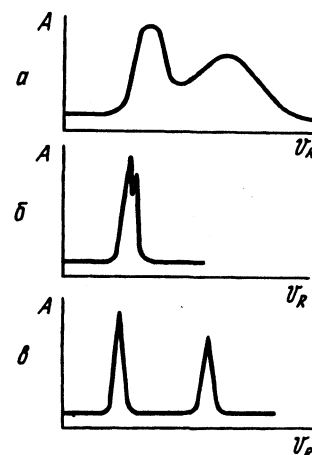


Рис. 8.6. Зависимость степени разделения смеси двух веществ от эффективности колонки и селективности сорбента: а — высокая селективность, но плохая эффективность; б — высокая эффективность, но плохая селективность; в — высокая эффективность, достаточная селективность

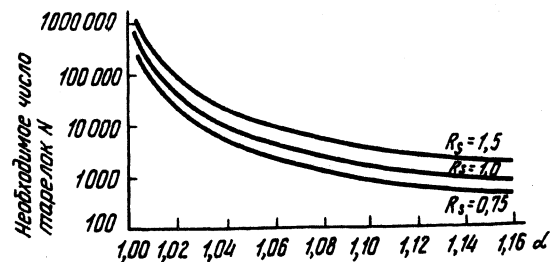


Рис. 8.7. Зависимость числа теоретических тарелок, необходимого для разделения веществ А и В, от α

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.

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 $\Delta t_R = 0,23$ мин. Далее находят ширину пиков у основания:

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

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

Если $\Delta t_R = w = 0,23$ мин, то $R_s = 1$, тогда $N = 16(15,05 / 0,23)^2 = 68506$ тарелок.

8.5. Аппаратура и обработка хроматограмм

8.5.1. Схема хроматографа

Хроматографическое разделение осуществляют в приборах — хроматографах, блок-схема хроматографа приведена на рис. 8.8. 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 анализа 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.

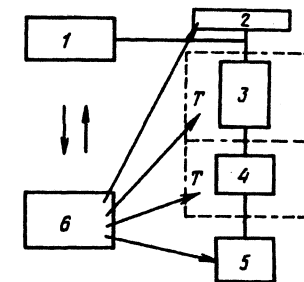


Рис. 8.8. Блок-схема хроматографа:

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

8.5.2. 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 (рис. 8.9);
- 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 рис. 8.10);

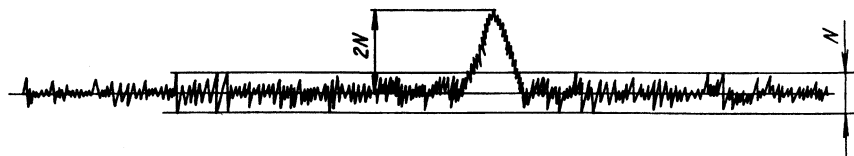


Рис. 8.9. Шум детектора и наименьшее детектируемое количество соединения: N — уровень шума; $2N$ — наименьшее детектируемое количество соединения

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

$$A_i = k[a_{i0}(c) - a_0], \quad (8.29)$$

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_i можно использовать в количественном анализе лишь в том случае, если $A_i = kc$, 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 послеклоночной реакцией. Прямое детектирование

проводят по увеличению сигнала детектора A_i [см. уравнение (8.29)] (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 ($a_0 \ll a_{i0}(c)$). Непрямое детектирование проводят по уменьшению сигнала детектора A_i при прохождении через него зоны определяемого вещества. При непрямом детектировании используют элюент, дающий постоянный отклик детектора, $a_0 \gg a_{i0}(c)$, который ос-

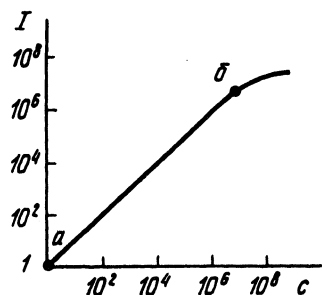


Рис. 8.10. Логарифмическая зависимость отклика детектора от концентрации вещества: аб — линейная область

лабеваает при прохождении через детектор разделенных веществ, не дающих такого отклика. 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 (рис. 8.11).

Послелоклоночную 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 (см. разд. 8.6.3). Для проведения послелоклоночной 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 рис. 8.12. 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

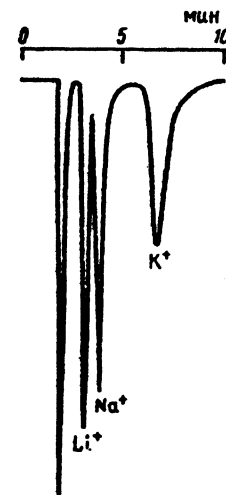


Рис. 8.11. Хроматограмма катионов щелочных металлов. Непрямое детектирование ($\lambda = 220$ нм). Колонка Zipax SCX; 4,6×120 мм. Скорость потока 0,5 мл/мин

своим свойствам, задачу решают с помощью селективного детектора. В ряде случаев для повышения селективности и уменьшения времени анализа используют комбинации универсальных и селективных детекторов (см. разд. 8.5.3). Однако, учи-

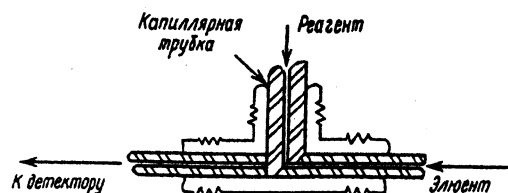


Рис. 8.12. Разрез смесительной камеры для проведения послелоклоночной реакции.

тая, 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. Принципы действия детекторов в ГХ и ЖХ подробно описаны в разд. 8.6.4 и 8.7.6.

8.5.3. 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 проводят 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 $t_{отн}$, т. е. по отношению удерживаемого объема определяемого компонента к удерживаемому объему вещества, принятого за стандарт:

$$t_{отн} = t_R / t_{R,ст} = V_R / V_{R,ст}$$

Эта величина зависит только от состава подвижной и неподвижной фаз.

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

$$I = 100 \frac{\lg t'_{R(x)} - \lg t'_{R(z)}}{\lg t'_{R(z+1)} - \lg t'_{R(z)}} + 100z. \quad (8.30)$$

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

Неизвестное соединение имеет исправленное время удерживания $t'_{R(x)} = 19,5$ мин. Исправленное время удерживания n -гексана и n -гептана в этих условиях соответственно равно 13,7 и 29,3 мин. Используя эти данные, рассчитываем индекс Ковача неизвестного соединения по уравнению (8.30):

$$I = 100 \frac{\lg 19,5 - \lg 13,7}{\lg 29,3 - \lg 13,7} + 100 \cdot 6 = 648,2.$$

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:

$$\lg V'_R = A + Bz, \quad (8.31)$$

$$\lg V'_R = A + BT_{кип}, \quad (8.32)$$

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 (8.31) и (8.32) $T_{кип}$ или индексы удерживания $100z$ используют для идентификации гомологов.

Пример 2. Определим температуру кипения предельного углеводорода, если при 80 °С и скорости потока газа-носителя 90 мл·мин⁻¹ на сорбенте Chromaton N с неподвижной фазой SE-30 получены следующие результаты:

Углеводород	t_R , с	$T_{\text{кип}}$, °С
C_6H_{14} (6)	70	68,8
C_7H_{16} (7)	120	98,5
C_8H_{18} (8)	210	125
C_xH_{2x+2} (x)	380	?

Пик неударживаемого компонента появляется на хроматограмме через 25 с.

Для нахождения коэффициентов A и B в уравнении (8.32) нужно вычислить исправленные параметры удерживания углеводородов t'_R и $\lg t'_R$, составить и решить систему уравнений:

Углеводород	t'_R , с	$\lg t'_R$ (y)	$T_{\text{кип}}$, °С (x)
(6)	45	1,6532	68,8
(7)	95	1,9777	98,5
(8)	185	2,2672	125
(x)	355	2,5502	?

В качестве системы уравнений возьмем, например, следующую:

$$\begin{cases} \lg t'_R(6) = A + B \cdot 68,8 \\ \lg t'_R(7) = A + B \cdot 98,5 \\ A = 1,6532 - 68,8B \\ 1,9777 = 1,6532 - 68,8B + 98,5B \\ B = 0,01092; A = 0,9019. \end{cases}$$

Тогда $\lg t'_R(x) = 0,9019 + 0,01092 T_{\text{кип}}$, отсюда $T_{\text{кип}} = 150,9$ °С.

Более точно коэффициенты A и B , а, следовательно, $T_{\text{кип}}$ углеводорода могут быть найдены при обработке прямой $y = A + Bx$ методом наименьших квадратов.

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 рис. 8.13. 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 углеводородов. Однако такие существенные различия в откликах наблюдаются не всегда. Обычное соотношение откликов селективного и неселективного детекторов лежит в пределах $10-10^3$.

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 (рис. 8.14). Обычно проводят касательные к тылу и фронту пика и соединяют их линией, парал-

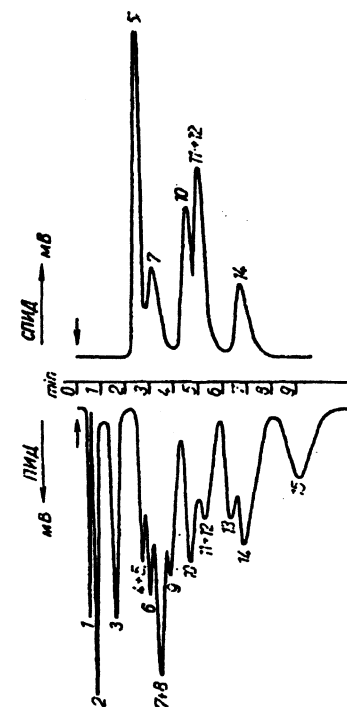


Рис. 8.13. Примеры хроматограмм, полученных при объединении пламенно-ионизационного детектора (ПИД) с селективным пламенно-ионизационным детектором (СПИД):

1 — метан; 2 — пентан; 3 — циклогексан; 4 — этилацетат; 5 — тетрагидрометан; 6 — метанол; 7 — метилхлорид; 8 — этанол; 9 — бензол; 10 — трихлорэтилен; 11 — хлороформ; 12 — тетрагидроэтилен; 13 — толуол; 14 — 1,2-дихлорэтан; 15 — изоамилацетат

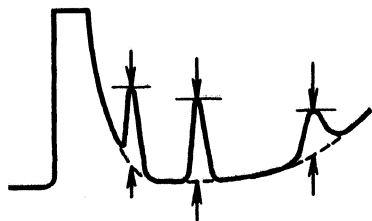


Рис. 8.14. Измерение высоты пика

лельной нулевой линии. 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 (рис. 8.15). 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 пика x на хроматограмме, можно рассчитать по формуле

$$x, \% = \frac{S_x}{S_x + S_y + S_z} 100,$$

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:

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

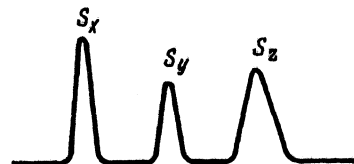


Рис. 8.15. Определение компонентов методом нормировки

Поправочные коэффициенты получают при анализе стандартных серий и рассчитывают по формуле

$$f_x = \frac{S_{ст}}{S_x} \frac{c_x}{c_{ст}} f_{ст},$$

где S_x , $S_{ст}$ — площади пиков определяемого и стандартного вещества; c_x , $c_{ст}$ — концентрации определяемого и стандартного вещества; $f_{ст}$ — 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 (рис. 8.16), либо определяют по формуле

$$x, \% = S_x k.$$

Градуировочный коэффициент k определяют при анализе проб стандартных серий смесей:

$$k = S/x, \%$$

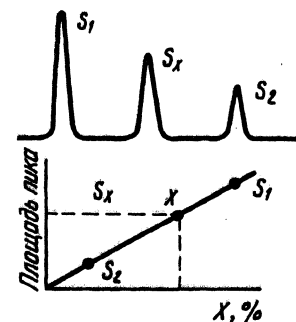


Рис. 8.16. Определение компонента методом внешнего стандарта

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

$$k = \frac{S_{в.ст}}{S_x} \frac{c_x}{c_{в.ст}},$$

где $S_{в.ст}$, S_x — площади пиков внутреннего стандарта и определяемого компонента; $c_{в.ст}$, c_x — концентрации стандарта и исследуемого вещества в

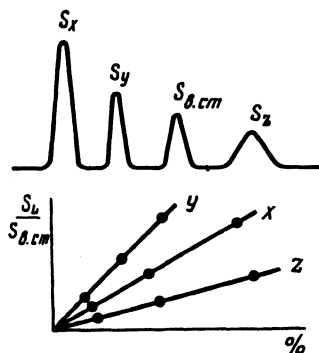


Рис. 8.17. Определение компонентов методом внутреннего стандарта

искусственных смесях. Зная поправочные коэффициенты, содержание компонента рассчитывают по формуле

$$x, \% = kr \frac{S_x}{S_{\text{в.ст}}} - 100,$$

где $r = m_{\text{в.ст}}/m_{\text{пробы}}$ (m — масса, г).

Результаты можно представить графически (рис. 8.17).

С помощью ГХ проведен анализ 0,09 г очищенного продукта на содержание циклогексана и толуола. В качестве внутреннего стандарта использован *n*-гептан. Были получены экспериментальные данные:

Вещество	Стандартная смесь		Исследуемый продукт	
	m , г	высота пика, см	m , г	высота пика, см
Циклогексан	0,06	3,60	x_1	4,60
Толуол	0,06	4,70	x_2	2,10
<i>n</i> -Гептан	0,06	4,50	0,045	4,12

Вначале рассчитаем поправочные коэффициенты для циклогексана k_1 и толуола k_2 по формуле, используя соответствующие высоты пиков:

$$k_1 = (h_{\text{в.ст}}/h_x)(m_x/m_{\text{в.ст}}) = (4,50/3,60) \cdot (0,06/0,06) = 1,25;$$

$$k_2 = (4,50/4,70) \cdot (0,06/0,06) = 0,95.$$

Содержание циклогексана и толуола в анализируемом продукте находим по формуле $x, \% = k \frac{m_{\text{в.ст}}}{m_x} \frac{h_x}{h_{\text{ст}}}$. Тогда

$$x_1, \% = (1,25 \cdot 0,045/0,09) \cdot (4,60/4,12) \cdot 100 = 69,78;$$

$$x_2, \% = (0,95 \cdot 0,045/0,09) \cdot (2,10/4,12) \cdot 100 = 24,21.$$

8.5.4. 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%.

8.6. 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 (см. разд 7.8) 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. Для быстрого и полного разделения достаточно, чтобы упругость пара была 1—4 мм при рабочей температуре колонки. Более летучим считается вещество, упругость паров которого выше. Количественный анализ можно провести только в том случае, если вещество термостойко, т. е. испаряется в дозаторе воспроизводимо и элюируется без разложения. При разложении вещества на хроматограмме появляются ложные пики, относящиеся к продуктам разложения. Вещество не должно образовывать устойчивых сольватов при растворении в неподвижной жидкой фазе и реагировать с материалами, из которых изготовлены детали хроматографа. Желательно работать с соединениями, которые легко получить с количественным выходом. Этим требованиям в боль-

шей 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 (см. разд. 6.2.5).

8.6.1. Газотвердофазная хроматография

Особенность метода газотвердофазной (газоадсорбционной) хроматографии (ГАХ) в том, что в качестве неподвижной фазы применяют адсорбенты с высокой удельной поверхностью ($10\text{--}1000\text{ м}^2\cdot\text{г}^{-1}$), и распределение веществ между неподвижной и подвижной фазами определяется процессом адсорбции. Адсорбция молекул из газовой фазы, т. е. концентрирование их на поверхности раздела твердой и газообразной фаз, происходит за счет межмолекулярных взаимодействий (дисперсионных, ориентационных, индукционных), имеющих электростатическую природу. Возможно образование водородной связи, причем вклад этого вида взаимодействия в удерживаемые объемы значительно уменьшается с ростом температуры. Комплексообразование для селективного разделения веществ в ГАХ используют редко.

Для аналитической практики важно, чтобы при постоянной температуре количество адсорбированного вещества на поверхности c_s было пропорционально концентрации этого вещества в газовой фазе c_m :

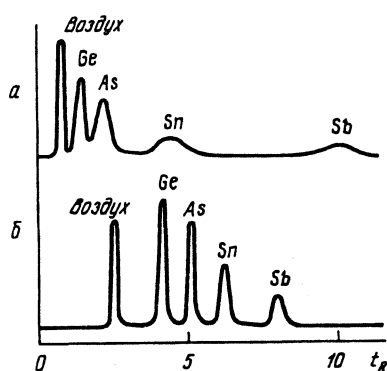


Рис. 8.18. Разделение гидридов элементов методом газовой хроматографии на колонке с порпакаком:

а — при постоянной температуре колонки — $85\text{ }^{\circ}\text{C}$; б — при программировании температуры от 75 до $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($8\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) (газ-носитель азот)

т. е. чтобы распределение происходило в соответствии с линейной изотермой адсорбции (k — константа). В этом случае каждый компонент перемещается вдоль колонки с постоянной скоростью, не зависящей от его концентрации. Разделение веществ обусловлено различной скоростью их перемещения. Поэтому в ГАХ чрезвычайно важен выбор адсорбента, площадь и природа поверхности которого обуславливают селективность (разделение) при заданной температуре.

С повышением температуры уменьшаются теплота адсорбции $\Delta H/T$, от которой зависит удерживание, и соответственно t_R . Это используют в практике

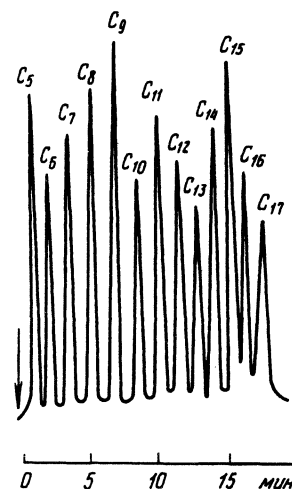


Рис. 8.19. Хроматограмма n -алканов $C_5\text{--}C_{17}$, полученная на колонке с силихромом С-80 при программировании температуры от 50 до $250\text{ }^{\circ}\text{C}$; скорость газ-носителя азота $2,1\text{ см}^3/\text{мин}$

анализа. Если разделяют соединения, сильно различающиеся по летучести при постоянной температуре, то низкокипящие вещества элюируются быстро, высококипящие имеют большее время удерживания, их пики на хроматограмме будут ниже и шире, анализ занимает много времени. Если же в процессе хроматографирования повышать температуру колонки с постоянной скоростью (программирование температуры), то близкие по ширине пики на хроматограмме будут располагаться равномерно (рис. 8.18).

В качестве адсорбентов для ГАХ в основном используют активные угли, силикагели, пористое стекло, оксид алюминия. Неоднородностью поверхности активных адсорбентов обусловлены основные недостатки метода ГАХ и невозможность определения сильно адсорбирующихся полярных молекул. Однако на геометрически и химически однородных макропористых адсорбентах можно проводить анализ смесей сильнополярных веществ. В последние годы выпускают адсорбенты с более или менее однородной поверхностью, такие, как пористые полимеры, макропористые силикагели (силихром, порасил, сферосил), пористые стекла, цеолиты.

Наиболее широко метод газоадсорбционной хроматографии применяют для анализа смесей газов и низкокипящих углеводородов, не содержащих активных функциональных групп (рис. 8.19). Изотермы адсорбции таких молекул близки к линейным. Например, для разделения O_2 , N_2 , CO , CH_4 , CO_2 с успехом применяют глинистые материалы (рис. 8.20). Температуру

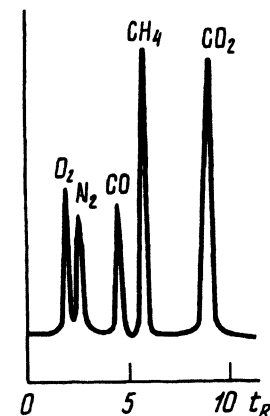


Рис. 8.20. Разделение неорганических газов методом газовой хроматографии на глинистом минерале сепиолите (температура колонки программируется от -78 до $70\text{ }^{\circ}\text{C}$)

колонки программируется для сокращения времени анализа за счет уменьшения t_R высококипящих газов. На молекулярных ситах — высокопористых природных или синтетических кристаллических материалах, все поры которых имеют примерно одинаковые размеры (0,4—1,5 нм), — можно разделить изотопы водорода. Сорбенты, называемые порапаками, используют для разделения гидридов металлов (Ge, As, Sn, Sb) (см. рис. 8.18). Метод ГАХ на колонках с пористыми полимерными сорбентами или углеродными молекулярными ситами самый быстрый и удобный способ определения воды в неорганических и органических материалах, например в растворителях.

8.6.2. Газожидкостная хроматография

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

Механизм распределения компонентов между носителем и неподвижной жидкой фазой основан на растворении их в жидкой фазе. Селективность зависит от двух факторов: упругости пара определяемого вещества и его коэффициента активности в жидкой фазе. По закону Рауля, при растворении упругость пара вещества над раствором p_i прямо пропорциональна его коэффициенту активности γ , молярной доле N_i в растворе и давлению паров чистого вещества P_i^0 при данной температуре:

$$p_i = \gamma_i N_i P_i^0.$$

Поскольку концентрация i -го компонента в равновесной паровой фазе определяется его парциальным давлением, можно принять, что $p_i \sim c_m$, а $N_i \sim c_s$. Тогда

$$D = \frac{c_s}{c_m} = \frac{N_i}{p_i} = \frac{1}{\gamma_i P_i^0},$$

а коэффициент селективности

$$\alpha = \frac{D_2}{D_1} = \frac{\gamma_1 P_1^0}{\gamma_2 P_2^0}.$$

Таким образом, чем ниже температура кипения вещества (чем больше P_i^0), тем слабее удерживается оно в хроматографической колонке. Если же тем-

пературы кипения веществ одинаковы, то для их разделения используют различия во взаимодействии с неподвижной жидкой фазой: чем сильнее взаимодействие, тем меньше коэффициент активности и больше удерживание.

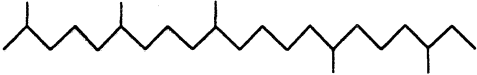
Неподвижные жидкие фазы. Для обеспечения селективности колонки важно правильно выбрать неподвижную жидкую фазу. Эта фаза должна быть хорошим растворителем для компонентов смеси (если растворимость мала, компоненты выходят из колонки очень быстро), нелетучей (чтобы не испарялась при рабочей температуре 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, гидроксил амины 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 высококипящих 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. В табл. 8.1 приведены жидкие фазы и максимальные температуры, при которых их можно использовать.

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.

Таблица 8.1. Неподвижные фазы в газожидкостной хроматографии

Название	Строение	$T_{\max}, ^\circ\text{C}$
Сквалан		125
Апиезон	Смешанные углеводороды	300
Силикон SE-30	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{Si}-\left[\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{Si}-\text{O}- \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} \right]_n-\text{Si}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	325
Силикон OV-17	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{Si}-\left[\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{Si}-\text{O}- \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array} \right]_n-\text{Si}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	325
Карбовакс 20М	$\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{H}$	210
DEGS	$\text{HO}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2-\text{O}-\underset{\text{O}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{O}}{\underset{ }{\text{C}}}-\text{O}-\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2\text{OH}$	200

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 хромсорба, 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 хромсорб W, газохром Q, 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.

8.6.3. Области применения газовой хроматографии

ГХ — один из самых современных методов многокомпонентного анализа, его отличительные черты — экспрессность, высокая точность, чувствительность, автоматизация. Метод позволяет решить многие аналитические проблемы. Количественный ГХ анализ можно рассматривать как самостоятельный аналитический метод, более эффективный при разделении веществ, относящихся к одному и тому же классу (углеводороды, органические кислоты, спирты и т. д.). Этот метод незаменим в нефтехимии (бензины содержат сотни соединений, а керосины и масла — тысячи), его используют при определении пестицидов, удобрений, лекарственных препаратов, витаминов, наркотиков и др. При анализе сложных многокомпонентных смесей успешно применяют метод капиллярной хроматографии, поскольку число теоретических тарелок для 100 м колонки достигает в этом случае $(2-3) \cdot 10^5$. На рис. 8.21 приведена хроматограмма выхлопных газов автомобиля, полученная с использованием капиллярной колонки.

Возможности метода ГХ существенно расширяются при использовании реакционной газовой хроматографии (РГХ), вследствие того что многие нелетучие, термонеустойчивые или агрессивные вещества непосредственно перед введением в хроматографическую колонку могут быть переведены с помощью химических реакций в другие — более летучие и устойчивые. Химические превращения осуществляют чаще на входе в хроматографическую

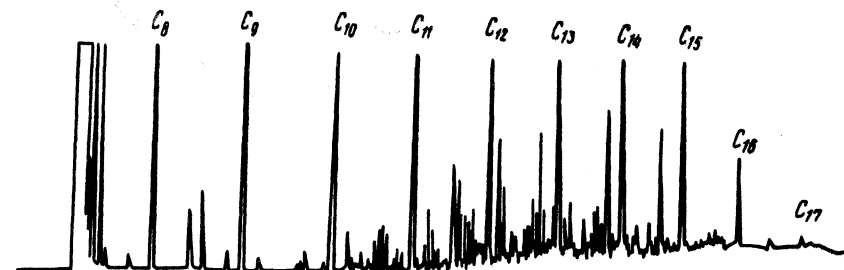


Рис. 8.21. Хроматограмма концентрата выхлопных газов автомобиля получена с использованием капиллярной колонки с $l = 50 \text{ м}$; неподвижная фаза — SP-400; программирование температуры от 50 до 200°C со скоростью $1,5^\circ\text{C}\cdot\text{мин}^{-1}$

колонку, иногда в самой колонке или на выходе из нее перед детектором. Значительно удобнее проводить превращения вне хроматографа. Недостатки метода РГХ связаны с появлением новых источников ошибок и возрастанием времени анализа.

Реакционную хроматографию часто используют при определении микроколичеств воды. Вода реагирует с гидридами металлов, с карбидом кальция или металлическим натрием и др., продукты реакции (водород, ацетилен) детектируются с высокой чувствительностью пламенно-ионизационным детектором. К парам воды этот детектор малочувствителен. Широко применяют химические превращения в анализе термически неустойчивых биологических смесей. Обычно анализируют смеси производных аминокислот, жирных кислот C_{10} — C_{20} , сахаров, стероидов. Для изучения высокомолекулярных соединений (олигомеры, полимеры, каучуки, смолы и т. д.) по продуктам их разложения используют пиролитическую хроматографию. В этом методе испарение пробы заменяют пиролизом. Карбонаты металлов можно проанализировать по выделяющемуся диоксиду углерода при обработке их кислотами.

Методом газовой хроматографии можно определять металлы, переводя их в летучие хелаты. Особенно пригодны для хроматографирования хелаты 2-, 3- и 4-валентных металлов с β -дикетонами. Лучшие хроматографические свойства проявляют β -дикетонаты Be(II), Al(III), Sc(III), V(III), Cr(III). Газовая хроматография хелатов может конкурировать с другими инструментальными методами анализа.

ГХ используют также в препаративных целях для очистки химических препаратов, выделения индивидуальных веществ из смесей. Метод широко применяют в физико-химических исследованиях: для определения свойств адсорбентов, термодинамических характеристик адсорбции и теплот адсорбции, величин поверхности твердых тел, а также констант равновесия, коэффициентов активности и др.

При помощи газового хроматографа, установленного на космической станции «Венера-12», был определен состав атмосферы Венеры. Газовые хроматографы устанавливают в жилых отсеках космических кораблей: организм человека выделяет много вредных веществ, и их накопление может привести к большим неприятностям. При превышении допустимых норм вредных веществ автоматическая система хроматографа дает команду прибору, который очищает воздух.

Термически лабильные вещества с низкой летучестью можно анализировать методом *сверхкритической флюидной хроматографии*. В этом методе в качестве подвижной фазы используют вещества в сверхкритическом состоянии при высоких давлении и температуре. Это могут быть диоксид углерода, *n*-пентан, изопропанол, диэтиловый эфир и др. Чаще применяют диоксид углерода, который легче перевести в сверхкритическое состояние, он нетоксичен, не воспламеняется, является дешевым продуктом. Преимущество этого метода, по сравнению с методом ВЭЖХ, — экспрессность,

обусловленная тем, что вязкость и плотность фаз в сверхкритическом состоянии мала, скорость потока подвижной фазы высокая и время удерживания компонентов пробы сокращается более чем в 10 раз. Поскольку чистота флюида во много раз больше чистоты любого растворителя, методом флюидной хроматографии получают более чистые фракции, чем в ВЭЖХ. В этом методе используют капиллярные колонки длиной 10—15 м, спектрофотометрический, термоионный и масс-спектрометрический детекторы.

8.6.4. Особенности газовых хроматографов

Остановимся на особенностях газовых хроматографов (см. рис. 8.8). Газ-носитель подается из баллона под определенным постоянным давлением, которое устанавливается при помощи специальных клапанов. Скорость потока в зависимости от размера колонки, как правило, составляет 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 хроматографирования 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 табл. 8.2.

Таблица 8.2. 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

Детектор по теплопроводности (катарометр). Универсальный детектор, наиболее широко используется в ГХ. В полость металлического блока помещена спираль из металла с высоким термическим сопротивлением (Pt, W, их сплавы, Ni) (рис. 8.22). Через спираль проходит постоянный ток, в результате чего она нагревается. Если спираль омывает чистый газ-носитель, спираль теряет постоянное количество теплоты и ее температура постоянна. Если состав газа-носителя содержит примеси, то меняется теплопроводность газа и соответственно температура спирали. Это приводит к изменению сопротивления нити, которое измеряют с помощью моста Уитстона (рис. 8.23). Сравнительный поток газа-носителя омывает нити ячеек R_1 и R_2 , а газ, поступающий из колонки, омывает нити измерительных ячеек C_1 и C_2 . Если у четырех нитей одинаковая температура (одинаковое сопротивление), мост находится в равновесии. При изменении состава газа, выходящего из колонки, сопротивление нитей ячеек C_1 и C_2 меняется, равновесие нарушается и генерируется выходной сигнал. На чувствительность ката-

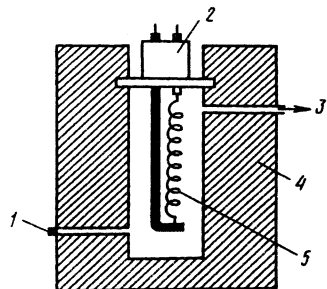


Рис. 8.22. Схема катарометра: 1 — ввод газа из колонки; 2 — изолятор; 3 — выход в атмосферу; 4 — металлический блок; 5 — нить сопротивления

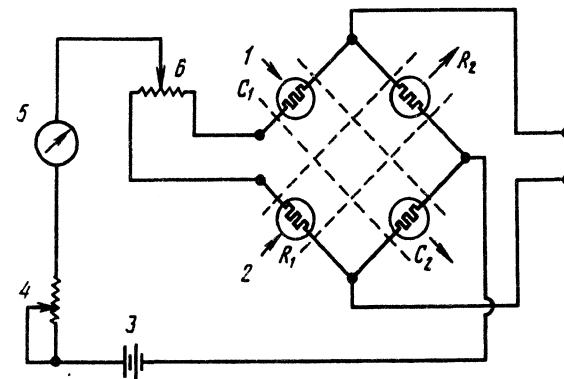


Рис. 8.23. Схема моста Уитстона: 1 — выход газа из колонки; 2 — ввод чистого газа-носителя; 3 — источник тока; 4 — регулятор тока, проходящего через нити; 5 — миллиамперметр; 6 — установка нуля

рометра сильно влияет теплопроводность газа-носителя, поэтому нужно использовать газы-носители с максимально возможной теплопроводностью, например гелий или водород.

Детектор электронного захвата представляет собой ячейку с двумя электродами (ионизационная камера), в которую поступает газ-носитель, прошедший через хроматографическую колонку (рис. 8.24). В камере он облучается постоянным потоком β -электронов, поскольку один из электродов изготовлен из материала, являющегося источником излучения (^{63}Ni , ^3H , ^{226}Ra). Наиболее удобный источник излучения — титановая фольга, содержащая адсорбированный тритий. В детекторе происходит реакция свободных электронов с молекулами определенных типов с образованием стабильных анионов:



В ионизованном газе-носителе (N_2 , He) в качестве отрицательно заряженных частиц присутствуют только электроны. В присутствии соединения, которое может захватывать электроны, ионизационный ток детектора уменьшается. Этот детектор дает отклик на соединения, содержащие галогены, фосфор, серу, нитраты, свинец, кислород; на большинство углеводов он не реагирует.

Пламенно-ионизационный детектор (ПИД). Схема ПИД приведена на рис. 8.25. Выходящий из колонки газ смешивается с водородом и поступает в форсунку горелки детектора. Образующиеся в пламени ионизованные частицы заполняют межэлектродное пространство, в результате

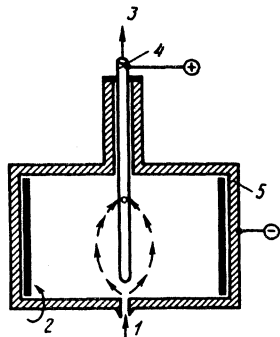


Рис. 8.24. Схема электронно-захватного детектора:

1 — ввод газа; 2 — источник излучения; 3 — вывод в атмосферу; 4, 5 — электроды

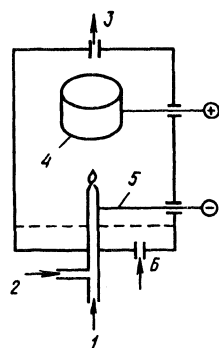


Рис. 8.25. Схема пламенно-ионизационного детектора:

1 — ввод газа из колонки; 2 — ввод водорода; 3 — вывод в атмосферу; 4 — собирающий электрод; 5 — катод; 6 — ввод воздуха

чего сопротивление снижается, ток резко усиливается. Стабильность и чувствительность ПИД зависит от подходящего выбора скорости потока всех используемых газов (газ-носитель ~30—50 мл/мин, H_2 ~30 мл/мин, воздух ~300—500 мл/мин). ПИД реагирует практически на все соединения, кроме H_2 , инертных газов, O_2 , N_2 , оксидов азота, серы, углерода, а также воды. Это детектор имеет широкую область линейного отклика (6—7 порядков), поэтому он наиболее пригоден при определении следов.

8.7. 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.

8.7.1. 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. раствори-

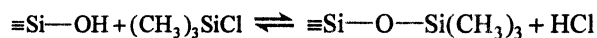
тель, должна обеспечить различную емкость колонки и эффективное разделение за приемлемое время.

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 $50 \text{ м}^2 \cdot \text{г}^{-1}$.

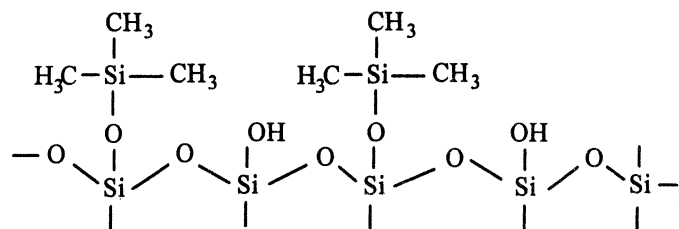
Полярные адсорбенты (SiO_2 , Al_2O_3 , оксиды металлов, флорисил и др.) имеют на поверхности слабокислотные OH-группы, способные удерживать вещества с основными свойствами. Эти адсорбенты применяют главным образом для разделения неполярных соединений и соединений со средней полярностью.

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.

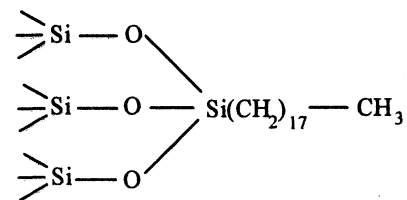
Неполярные адсорбенты (графитированная сажа, кизельгур, диатомит) не проявляют селективности к полярным молекулам. Используют также сорбенты с привитыми неполярными фазами, например силикагель с алкилсилильными группами от C_2 до C_{22} . Чтобы на силикагель легче было привить неполярную неподвижную фазу, проводят силанизацию SiO_2 триметилхлорсиланом:



и получают соединения типа



Экранировать силанольные OH-группы силикагеля удастся алифатическими углеводородами с C_3 и C_4 , но получить относительно высокие значения емкости k' и большее удерживание удастся при введении более длинных алкильных цепочек, предпочтительнее с C_{18} . Например, у сорбента, называемого «щеточным», поверхность силикагеля покрыта длинными углеводородными цепями:



Такие сорбенты с успехом используют при определении многих соединений.

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 *n*-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* 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 Снайтера имеет вид (в скобках приведены значения элюирующей силы): пентан (0) < *n*-гексан (0,01), гептан (0,01) < циклогексан (0,04) < CCl₄ (0,18) < бензол (0,32) < CHCl₃ (0,38) < ацетон (0,51), этанол (0,88) < вода, CH₃COOH (очень большая).

Т а б л и ц а 8.3. Свойства важнейших растворителей для адсорбционной хроматографии

Элюент	Элюирующая сила для Al ₂ O ₃	Дизлек-трическая проницаемость	Вязкость, сП (20 °С)	Показатель преломления (20 °С)	Длина волны УФ-детектора, нм
<i>n</i> -Пентан	0,00	1,84	0,235	1,358	200
<i>n</i> -Гексан	0,01	1,88	0,33	1,375	200
<i>n</i> -Гептан	0,01	1,92	0,42	1,388	200
Изооктан	0,01	1,94	0,50	1,391	200
Циклогексан	0,04	2,02	0,98	1,426	210
Тетрахлорид углерода	0,18	2,24	0,97	1,466	265
Диизопропиловый эфир	0,28	3,8	0,37	1,368	220
Толуол	0,29	2,38	0,59	1,496	290
<i>n</i> -Пропилхлорид	0,30	7,7	0,35	1,389	225
Бензол	0,32	2,28	0,65	1,501	290
Этилбромид	0,37	9,34	0,39	1,421	230
Этиловый эфир	0,38	4,33	0,23	1,353	220
Хлороформ	0,40	4,8	0,57	1,443	250
Метиленхлорид	0,42	8,93	0,44	1,424	250
Тетрагидрофуран	0,45	7,58	0,46	1,407	220
Этиленхлорид	0,49	10,7	0,79	1,445	230
Метилэтилкетон	0,51	18,5	0,4	1,379	330
Ацетон	0,56	21,4	0,32	1,359	330
Диоксан	0,56	2,21	1,54	1,422	220
Этилацетат	0,58	6,11	0,45	1,370	260
Метилацетат	0,60	6,68	0,37	1,362	260
Нитрометан	0,64	35,9	0,65	1,382	380
Ацетонитрил	0,65	37,5	0,37	1,344	210
Пиридин	0,71	12,4	0,94	1,510	310
<i>n</i> -Пропанол	0,82	21,8	2,3	1,38	200
Этанол	0,88	25,8	1,2	1,361	200
Метанол	0,95	33,6	0,6	1,329	200
Гликоль	1,11	37,7	19,9	1,427	200
Вода	Очень большая	80,4	1,00	1,333	180
Формамид		110	3,76	1,448	
Уксусная кислота		6,1	1,26	1,372	

Для обращенно-фазовой хроматографии на C₁₈ элюотропный ряд имеет вид: метанол (1,0) < ацетонитрил (3,1), этанол (3,1) < изопропанол (8,3) < *n*-пропанол (10,1) < диоксан (11,7). Свойства важнейших растворителей приведены в табл. 8.3.

Часто применяют не индивидуальные растворители, а их смеси. Незначительные добавки другого растворителя, особенно воды, существенно увеличивают элюирующую силу элюента. Например, *n*-пентан (0,00), *n*-пентан + 10% изопропилхлорида (0,10), *n*-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 удержание компонентов.

Механизм удерживания в ЖХ чаще бывает смешанным, т. е. удержание происходит по адсорбционному, распределительному, эксклюзионному 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 удержание 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 октадецилсилианом 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.

8.7.2. Распределительная хроматография

Метод распределительной, или жидкостно-жидкостной, хроматографии основан на распределении вещества между двумя несмешивающимися жидкостями, подобно тому, как это происходит в многократной ступенчатой экстракции. Жидкую неподвижную фазу наносят на пористый достаточно инертный сорбент, как в газожидкостной хроматографии, и заполняют им разделительную колонку. При пропускании жидкой подвижной фазы через колонку смесь разделяется на компоненты главным образом за счет их различной растворимости в жидкой неподвижной фазе и в основном по тем же механизмам, что и в газожидкостной хроматографии. Обычно растворимость компонентов пробы в подвижной и неподвижной жидких фазах, обладающих разной полярностью, сильно различается. Если растворимость пробы выше в неподвижной фазе, время удерживания компонентов значительно возрастает, если растворимость выше в подвижной фазе, то время удерживания может быть близким к t_m — времени удерживания несорбируемого компонента. Чтобы добиться разделения, в подвижную фазу, насыщенную неподвижной, включают третий компонент, снижающий различие в полярности подвижной и неподвижной фаз, например к смеси из неполярного (гексан) и полярного (вода) растворителей прибавляют спирт. Только в этом случае удается подобрать оптимальные условия для разделения компонентов смеси.

Обычно полярный растворитель (вода, спирт) фиксирован на твердом носителе — силикагеле, диатомите, целлюлозе, оксиде алюминия. Подвижной фазой в этом случае служат неполярные растворители — изооктан, бензол и др. Такие системы используют в *нормально-фазовой распределительной хроматографии*.

Если неполярный растворитель зафиксировать на носителе, а в качестве подвижной фазы использовать полярные растворители (вода, спирт, буфер-

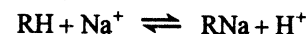
ные растворы, сильные кислоты), то такой вариант называют *обращенно-фазовой распределительной хроматографией*.

Нанесенные жидкие фазы имеют большой недостаток — они быстро смываются подвижной жидкой фазой с поверхности носителя, особенно при использовании таких систем в ВЭЖХ, т. е. при повышенном давлении в колонке. Поэтому жидкие фазы прививают к носителю. В качестве носителей неподвижных жидких фаз для нормально-фазовой распределительной хроматографии используют силикагели с привитыми нитрильными, аминными и другими группами. В обращенно-фазовом варианте распределительной хроматографии используют силикагели с привитыми алкилсилильными группами от C_2 до C_{22} . Механизм удерживания на таких сорбентах сложен (см. разд. 7.6.3).

8.7.3. Ионообменная, ионная, ион-парная хроматографии

В основе методов ионообменной, ионной и ион-парной хроматографии лежит динамический процесс замещения ионов, связанных с неподвижной фазой, ионами элюента, поступающими в колонку. Основная цель хроматографического процесса — разделение органических или неорганических ионов с зарядом одного и того же знака. Удерживание в этих видах хроматографии определяется изменением свободной энергии реакции ионного обмена. Соотношение концентраций обменивающихся ионов в растворе и в фазе сорбента определяется ионообменным равновесием.

Некоторые физико-химические свойства ионообменников. Ионный обмен заключается в том, что некоторые вещества (ионообменники) при погружении в раствор электролита поглощают из него катионы или анионы, выделяя в раствор эквивалентное число других ионов с зарядом того же знака. Между катионообменником и раствором происходит обмен катионов, между анионообменником и раствором — обмен анионов. Катионообменники часто представляют собой специально синтезированные полимерные нерастворимые в воде вещества, содержащие в своей структуре ионогенные группы кислотного характера: $-\text{SO}_3\text{H}$; $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{PO}_3\text{H}_2$; $-\text{AsO}_3\text{H}_2$. Химические формулы катионообменников схематически можно изобразить следующим образом: RSO_3H ; RSO_3Na или просто $\text{R}-\text{H}$, $\text{R}-\text{Na}$. В первом случае катионообменник находится в H -форме, во втором — в Na -форме; R — полимерная матрица. Катионообменные реакции записывают как обычные химические гетерогенные реакции:



Анионообменники содержат в своей структуре ионогенные группы основного характера: $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$; $=\text{NH}_2^+$; $\equiv\text{NH}^+$ и др. Их химические форму-

лы могут быть изображены как RNH_2OH и RNH_2Cl (или R-OH , R-Cl). В первом случае анионообменник находится в OH- форме, во втором — в Cl- форме. Анионообменную реакцию можно записать следующим образом:



Известны амфотерные ионообменники, содержащие в своей структуре и кислотные и основные группы. Ионообменники, содержащие одготипные (например, $-\text{SO}_3$) кислотные (основные) группы, называют монофункциональными; ионообменники, содержащие разготипные (например, $-\text{SO}_3\text{H}$ и $-\text{OH}$) кислотные (основные) группы, — полифункциональными. Характер ионогенных групп легко определить потенциометрическим титрованием (катионообменники титруют щелочью, анионообменники — кислотой). Кривые титрования ионообменников аналогичны кривым титрования растворимых сильных кислот, слабых кислот и их смесей.

Ионообменники получают реакциями поликонденсации либо полимеризации. Методом поликонденсации чаще получают полифункциональные ионообменники, методом полимеризации — монофункциональные. Поликонденсацию или полимеризацию необходимо провести так, чтобы полученные линейные цепи были достаточно разветвлены и связаны друг с другом «мостиками». При получении катионообменников полимеризационного типа чаще в качестве сшивающего агента для создания межцепных (поперечных) связей применяют дивинилбензол (ДВБ). Пористость (сетчатость) ионообменника определяется степенью сшивания матрицы, которая характеризуется процентным содержанием ДВБ в полимерной смеси стиролов, используемых для синтеза. Процесс сшивания управляем, поэтому можно получать ионообменники нужной пористости. Процент ДВБ обычно составляет от 1 до 16. Наиболее часто используемые ионообменники содержат 4—9% ДВБ.

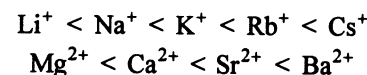
Максимальное количество ионов, которое может связать ионообменник, определяется его теоретической емкостью, последняя совпадает с содержанием в ионообменнике ионогенных групп. Емкость относят к единице массы или объема и обычно выражают в миллиэквивалентах или миллимолях на 1 г сухого или на 1 мл набухшего ионообменника в H- или Cl- форме.

Ионообменники нерастворимы в воде, но если сухой ионообменник поместить в воду, он будет ее поглощать, происходит его набухание. Причиной набухания является наличие в структуре ионообменников гидрофильных ионогенных групп. Чем их больше, чем выше емкость сорбента, тем более он склонен к набуханию. Набухание зависит не только от числа ионогенных групп, но и от их природы, степени ионизации, заряда противоиона, от концентрации внешнего раствора (чем она меньше, тем больше набухание). Конечно, чем больше плотность матрицы (т. е. содержание ДВБ), тем меньше набухание ионообменника. В аналитической практике набухание может иг-

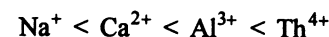
рать отрицательную роль — нарушается упаковка колонки (слой «дышит»). Поэтому в высокоэффективной ионообменной, ионной и ион-парной хроматографии применяют ионообменники малой емкости со сравнительно прочной структурой матрицы (практически ненабухающие).

Селективность ионного обмена. Ионообменники, содержащие в своей структуре сильнокислотные или сильноосновные группы, вступают в реакции обмена с любыми ионами раствора, обладающими зарядом того же знака, что и знак противоиона. Такие ионообменники называют универсальными.

Экспериментально установлены ряды сродства, или селективности, ионов по отношению к ионообменникам. Так, при низких концентрациях раствора на сильнокислотных катионообменниках ионы с одинаковым зарядом сорбируются в такой последовательности:



Для ионов с разными зарядами сорбируемость увеличивается с увеличением заряда:



Можно наблюдать обращение ряда с изменением условий проведения реакции ионного обмена. Ряды сродства установлены и для анионообменников, например для сильноосновного анионообменника сорбируемость анионов увеличивается в ряду



Для решения практических задач варьируют условия разделения элементов подбором подходящей подвижной фазы (концентрация, pH, ионная сила, состав). Способы достижения селективности различны (например, присутствие органического растворителя в подвижной фазе); влияя на устойчивость и состав комплексов разделяемых компонентов, можно выделить многие элементы (рис. 8.26).

Повышения селективности ионообменников можно добиться и другими путями. Так, изменяя пористость сорбента, т. е. число поперечных связей в матрице, можно создать ионитовые сита, проницаемые для одних ионов и способные к их обмену и непроницаемые для других. Можно также изменить природу и взаимное расположение ионогенных групп, а также получить сорбенты, способные к селективным химическим реакциям за счет комплексообразования в фазе ионообменников.

Высокой селективностью обладают хелатообразующие ионообменники, содержащие в своей структуре комплексообразующие группы органических реагентов диметилглиоксима, дитизона, 8-оксихинолина и др. (см. разд. 6.24).

Так, сорбенты, содержащие краун-эфиры, поглощают ионы щелочных, щелочно-земельных и некоторых других элементов. Однако во всех случаях ионообменное равновесие определяется доминирующей реакцией противоионов с ионогенными группами матрицы, с коионами в растворе и с водой в обеих фазах.

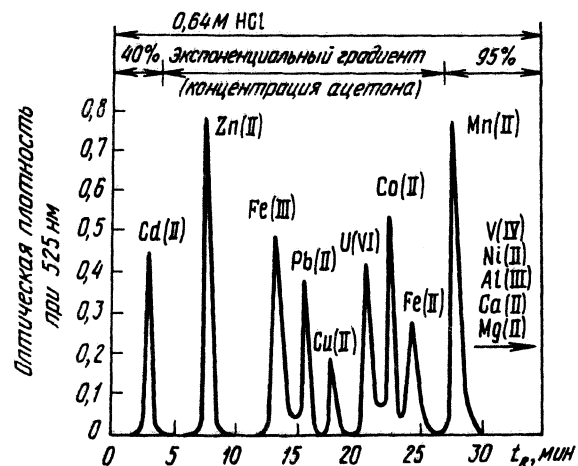


Рис. 8.26. Разделение анионных хлоридных комплексов Cd, Zn, Fe(III), Pb, Cu, V(IV), Mn, Ni, U(VI), Co(II), Fe(II) на анионообменнике амберлит-200 с использованием градиентного элюирования раствором HCl, содержащим ацетон

Неподвижные фазы. В ионообменной, ионной и ион-парной хроматографии в качестве неподвижных фаз используют неорганические и органические ионообменные материалы. Наибольшее значение имеют синтетические макро- и микросетчатые органические ионообменники. Эти ионообменники имеют большую обменную емкость (3—7 ммоль/г), их используют в классической ионообменной хроматографии, а также в ионной хроматографии в компенсационных колонках. Микросетчатые ионообменники способны к обмену ионов только в набухшем состоянии, макросетчатые — в набухшем и ненабухшем состояниях. Другим структурным типом ионообменников являются поверхностно-пленочные ионообменники, твердая сердцевина которых изготовлена из сополимеров стирола и дивинилбензола, стекла или силикагеля и окружена тонкой пленкой ионообменника. Толщина пленки 1 мкм, общий диаметр частицы 40 мкм. Недостатком таких сорбентов является достаточно большой диаметр их частиц и малая емкость из-за низкой удельной поверхности, что вынуждает работать с малыми пробами и высокочувствительными детекторами. Эти сорбенты достаточно быстро отравляются, их не регенерируют.

Большое распространение в ВЭЖХ получили объемно-пористые сорбенты с диаметром частиц 5—10 мкм. Поэтому в ионной хроматографии применяют объемно-пористые полистирольные ионообменники с $d_p \sim 10$

мкм, объемно-пористые кремнеземы с $d_p \sim 5$ —10 мкм, поверхностно-пористые ионообменники, практически не набухающие, емкостью 0,02—0,05 ммоль/г, а также поверхностно-модифицированные ненабухающие сополимеры стирола и дивинилбензола с ионогенными сульфо- или аминогруппами емкостью 0,01—0,2 ммоль/г и диаметром частиц 40—60 мкм. Например, зерно латексного анионообменника состоит из трех слоев. Ядро представляет собой инертный сополимер стирола и ДВБ, затем следует катионообменный слой сольватированных сульфогрупп; последний слой (ионогенный) — аминированный латекс толщиной 0,1—0,5 мкм.

В ион-парной хроматографии используют (см. разд. 8.7.1) «щеточные» сорбенты — силикагели с привитыми обращенными фазами C_2 , C_8 , C_{18} . Эта фаза легко превращается в катионо- или анионообменник при поглощении из подвижной фазы ионогенных поверхностно-активных веществ, например алкилсульфатов или солей четвертичных аммониевых оснований.

Подвижные фазы. Хроматографические разделения с использованием ионообменников чаще всего проводят в водных растворах, так как вода обладает прекрасными растворяющими и ионизирующими свойствами. Под действием воды молекулы пробы мгновенно диссоциируют на ионы, ионогенные группы ионообменников гидратируются и также переходят в полностью или частично диссоциированную форму. Это обеспечивает быстрый обмен противоионов. На элюирующую силу подвижной фазы основное влияние оказывают pH, ионная сила, природа буферного раствора, содержание органического растворителя или поверхностно-активного вещества (ион-парная хроматография).

Значение pH выбирают в зависимости от природы ионогенных групп разделяемых ионов, природы матрицы. С сильнокислотными и сильноосновными ионообменниками можно работать в интервале pH 2—12, со слабокислотными 5—12, слабоосновными 2—6. Сорбенты на основе кремнезема из-за растворения матрицы нельзя использовать при pH ≥ 9 . При разделении слабых оснований $pH = pK - 1,5$, а при разделении слабых кислот $pH = pK + 1,5$. Ионная сила подвижной фазы влияет на емкость ионообменника. Обычно с увеличением ионной силы сорбция ионов уменьшается, возрастает элюирующая сила подвижной фазы. Поэтому в начале разделения подвижная фаза должна иметь малое значение ионной силы (0,05—0,1), конечное значение не должно превышать 2. При градиентном элюировании часто используют буферы с увеличивающейся ионной силой.

Для селективного элюирования поглощенных ионов можно использовать воду, буферный раствор (фосфатный, ацетатный, боратный, гидрокарбонатный и др.) с определенным значением pH и ионной силы, растворы минеральных (соляная, азотная, серная, фосфорная) и органических (фенол, лимонная, молочная, винная, щавелевая, ЭДТА) кислот. Выбор элюента облегчается тем, что предельные коэффициенты распределения большинства

элементов между водными (водно-органическими) растворами многих комплексообразующих реагентов и ионообменниками стандартного типа определены и представлены в таблицах.

Ионообменное равновесие. Процесс ионного обмена обратим и стехиометричен. Состояние равновесия, к которому стремится система, называют ионообменным равновесием



где А, В — ионы в растворе; $\bar{A}$, $\bar{B}$ — ионы в фазе ионообменника. Термодинамическая константа равновесия определяется соотношением

$$k_{B/A} = \frac{a_{\bar{B}} a_A}{a_{\bar{A}} a_B} = \frac{x_{\bar{B}} x_A \gamma_{\bar{B}} \gamma_A}{x_{\bar{A}} x_B \gamma_{\bar{A}} \gamma_B}, \quad (8.33)$$

где a_A , a_B , $a_{\bar{A}}$, $a_{\bar{B}}$ — активности соответствующих ионов в растворе и в фазе ионообменника; γ_A , $\gamma_{\bar{A}}$, γ_B , $\gamma_{\bar{B}}$ — коэффициенты активности; $x_{\bar{A}}$, $x_{\bar{B}}$ — эквивалентные доли противоионов А и В в ионообменнике; x_A , x_B — эквивалентные доли тех же ионов в растворе; $x_A + x_B = 1$, $x_{\bar{A}} + x_{\bar{B}} = 1$.

Количественный расчет равновесия затруднен, так как не существует независимых способов определения отношения коэффициентов активности в фазе ионообменника (см. разд. 7.6.3). Для описания ионообменного равновесия используют коэффициент селективности, исправленный коэффициент селективности и коэффициент распределения.

Коэффициент селективности отражает суммарный результат всех взаимодействий в фазе раствора и в фазе ионообменника, а также характеризует относительную способность ионообменника извлекать один из двух ионов из данного раствора, т. е. в количественной форме выражает относительный ионный состав двух фаз.

Для обмена противоионов разного заряда выражение для коэффициента селективности приобретает вид

$$k_{B/A} = \frac{x_{\bar{B}}^a x_A^b}{x_{\bar{A}}^b x_B^a}, \quad (8.34)$$

где a и b — заряды ионов А и В. Коэффициент селективности вычисляют из экспериментальных данных. Если обменивающиеся ионы имеют одинаковый по величине заряд, то $k_{B/A}$ не зависит от единиц измерения концентраций в фазах раствора и сорбента. При обмене ионов с различным числом зарядов числовое значение $k_{B/A}$ зависит от размерности концентраций в обеих фазах. Для выражения концентраций в растворе обычно используют молярные и эквивалентные доли, для фазы ионообменника — молярные либо эквивалентные доли.

Исправленный коэффициент селективности получают, заменяя в выражении для коэффициента селективности эквивалентные доли ионов А и В в растворе активностями:

$$k'_{B/A} = \frac{a_A x_{\bar{B}}}{a_B x_{\bar{A}}} = \frac{x_{\bar{B}} x_A \gamma_A}{x_{\bar{A}} x_B \gamma_B}. \quad (8.35)$$

Отношение γ_A/γ_B показывает, насколько стремление иона В покинуть фазу раствора больше или меньше, чем стремление иона А. Используя исправленный коэффициент селективности вместо коэффициента селективности, мы как бы исключаем ту долю селективности, которая зависит от свойств раствора и обусловлена взаимодействиями в растворе.

Для описания ионообменного равновесия на практике чаще используют коэффициент распределения D , который определяют в статических или динамических условиях. При помощи коэффициента распределения рассчитывают удерживаемые объемы разделяемых ионов:

$$V_R = V_m + D V_s.$$

Для понимания процессов ионного обмена и ионной хроматографии полезно кроме самого ионообменного равновесия рассматривать и скорость его установления.

Кинетика ионного обмена. При ионном обмене происходит перенос противоионов в фазе ионообменника и в растворе к границе раздела фаз и от нее. Переносу ионов в растворе к поверхности раздела фаз способствует перемешивание. Однако даже при самом эффективном перемешивании раствора зерно ионообменника окружено неподвижной жидкой пленкой раствора толщиной примерно 10^{-3} — 10^{-2} см. Процесс ионного обмена между зернами ионообменника и хорошо перемешиваемым раствором сводится к трем последовательным стадиям: диффузия обменивающихся противоионов через стационарную пленку, окружающую зерно ионообменника (пленка Нернста); диффузия их в зерно ионообменника; химический обмен. Последняя стадия протекает практически мгновенно, поэтому ионный обмен рассматривают как чисто диффузионный процесс, скорость которого определяется самой медленной стадией; либо диффузией в пленке (пленочная кинетика), либо диффузией в зерне (гелевая кинетика).

Диффузия в пленке может быть скоростьюопределяющей стадией в системе с высокой концентрацией фиксированных ионов, малой степенью поперечной связанности ионообменника, небольшим размером зерен, низкой концентрацией раствора ($< 0,01$ М). При обмене в концентрированных растворах ($> 0,01$ М) лимитирующая стадия, как правило, — диффузия в геле. Скорость обмена в большинстве хроматографических колонок определяется диффузией в зерне. При средних скоростях потока подвижной фазы в колонке и больших значениях коэффициента распределения лимитирующей стадией является диффузия в пленке. При увеличении скорости потока подвижной фазы уменьшается толщина пленки Нернста, скорость массообмена растет.

При использовании поверхностно-пленочных сорбентов с толщиной ионогенного слоя 1—3 мкм или поверхностно-модифицированных латексных анионообменников с толщиной ионогенного слоя 0,1—0,5 мкм достигается высокая скорость массопереноса благодаря тому, что путь диффузии обменивающихся ионов чрезвычайно короткий, вклад продольной и вихревой диффузии в размывание хроматографической полосы уменьшается, что и обеспечивает получение высокоэффективных колонок.

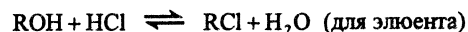
Особенности метода ионной хроматографии. Это экспрессный метод определения органических и неорганических ионогенных соединений, сочетающий ионообменное разделение с высокочувствительным кондуктометрическим детектированием. Последнее возможно только при низкой фоновой электропроводности. Используют двух- и одноколоночные варианты.

В основу метода положено: элюентное ионообменное разделение катионов или анионов в разделяющей колонке, заполненной ионообменником низкой емкости; подавление фонового сигнала элюента в подавляющей (компенсационной) колонке, заполненной ионообменником с высокой емкостью; кондуктометрическое детектирование ионов после разделения (двухколоночный вариант).

При разделении катионов с использованием в качестве элюента 0,001 М НСl в разделяющей колонке с катионообменником происходит ионный обмен



и разделение катионов. В подавляющей колонке на анионообменнике в ОН-форме происходит обмен анионов элюента и анионов разделяемых солей на ОН-группы анионообменника:



В результате элюент преобразуется в воду, а разделяемые ионы M^+ кондуктометрически детектируются в виде гидроксидов (сильные электролиты).

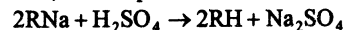
При разделении анионов с использованием в качестве элюента 0,001 М NaOH в разделяющей колонке, заполненной анионообменником, происходит анионный обмен и разделение анионов:



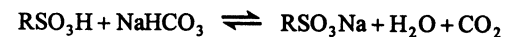
В подавляющей колонке на катионообменнике большой емкости катионы образца и элюента обмениваются на противоионы катионообменника, в результате чего элюент преобразуется в воду, а анионы A^- детектируются в виде сильных кислот (НА):



Если подавляющая колонка с катионообменником полностью переходит в солевую форму, ее регенерируют 0,25 М серной кислотой:



При разделении анионов в качестве элюентов часто используют карбонат и гидрокарбонат натрия, тогда реакции в подавляющей колонке можно записать так:



При использовании элюентов с низкой электрической проводимостью кондуктометрический детектор присоединяют непосредственно к разделяющей колонке. Такой вариант ионной хроматографии назван одноколоночным. В качестве элюентов применяют ароматические кислоты или их соли, рН элюентов изменяется от 3 до 8. Используют и другие детекторы, например спектрофотометрический, люминесцентный, полярографический — в этом одно из преимуществ одноколоночного варианта. Однако пределы обнаружения ионов в одноколоночном варианте ионной хроматографии обычно выше, чем в двухколоночном, а линейность градуировочного графика находится в более узком интервале. Примеры эффективных разделений методом ионной хроматографии приведены на рис. 8.27 и 8.28.

Особенности метода ион-парной хроматографии. Этот метод расширяет возможности использования ВЭЖХ и сорбентов на основе силикагеля с привитыми алкильными группами C_8 — C_{18} и позволяет определять ионизированные вещества. Последние обычно слабо удерживаются на неполярной поверхности силикагеля, содержащей связанные алкильные группы, из-за высокой растворимости в полярной подвижной фазе (например, в воде), быстро элюируются и поэтому плохо разделяются. Для увеличения взаимодействия ионогенных соединений с неполярной неподвижной фазой ее динамически

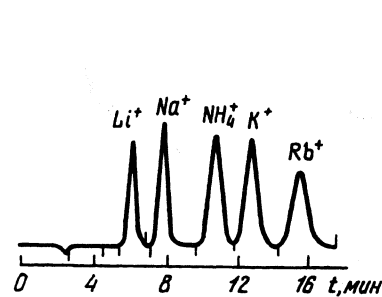


Рис. 8.27. Разделение микроколичеств однозарядных катионов методом ионной хроматографии

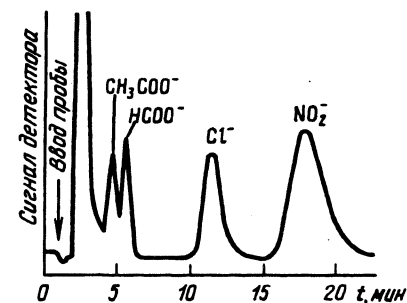


Рис. 8.28. Разделение некоторых анионов методом ионной хроматографии при pH 6,25 с использованием в качестве элюента бензоата калия на анионообменнике VydacSC

модифицируют, т. е. в элюент вводят небольшое количество (10^{-2} — 10^{-3} М) вещества, называемого ион-парным реагентом, обычно имеющим достаточно большую органическую часть и хорошо адсорбирующимся алкилированным силикагелем. Адсорбированный реагент модифицирует поверхность сорбента таким образом, что она становится аналогичной поверхности обычного ионообменника.

В качестве ион-парного реагента часто используют алкиламины, алкилсульфонаты, алкилсульфаты и другие ионогенные поверхностно-активные вещества.

Возможны два механизма удерживания и разделения ионных соединений методом ион-парной хроматографии.

1. Ион-парный реагент сорбируется на обращенной фазе за счет неспецифических взаимодействий, например с октадецилсиланом. В зависимости от природы ион-парного реагента полученный при этом сорбент можно рассматривать как катионо- или анионообменник. Так, для разделения Ag, Cu, Ni, Co, Au и Fe(III) в виде анионных комплексов с цианидом в качестве ион-парного реагента в подвижную фазу (метанол) вводят водный $2,5 \cdot 10^{-3}$ М раствор гидросульфата тетрабутиламмония (65:35). Обращенная фаза превращается в анионообменник, на котором за 30 мин может быть выполнен анализ смеси рассматриваемых анионов. Если поверхность неполярного сорбента модифицировать перхлорат-, хлорид- и бромид-ионами, алкилсульфонатом (RSO_3^-) или алкилсульфатом (RSO_4^-), то сорбент будет выступать в роли катионообменника.

2. Ион-парный реагент образует с разделяемыми соединениями ионную пару в растворе, которая в соответствии со своими свойствами сорбируется на обращенной фазе кремнийорганическим сорбентом. Примером является разделение ароматических кислот (HR). В подвижную фазу вводят хлорид тетрабутиламмония (ТБА), что приводит к образованию ионных пар в подвижной фазе $\text{TBA}^+ + \text{HR} \rightarrow [\text{R}^- \text{TBA}^+] + \text{H}^+$. Эти пары лучше удерживаются поверхностью силикагеля и более селективно за счет неспецифических взаимодействий с привитыми алкильными цепями (рис. 8.29).

Особенности лигандообменной хроматографии. Сущность метода заключается в том, что ион-комплексобразователь (Ag, Fe, Co, Ni, Cu, Co, Hg и др.), жестко связанный с ионогенной группой ионообменника, неподвижен и может обменивать координированные им лиганды на другие, находящиеся в подвижной фазе. Основное условие лигандообменной хроматографии — лабильность комплексных соединений, образуемых металлом с разделяемыми лигандами. Только в этом случае происходит быстрое замещение одного лиганда в фазе сорбента другим.

Метод лигандообменной хроматографии был предложен Ф. Гельфери-хом (1961), который для выделения диамина из разбавленного аммиачного раствора использовал хроматографическую колонку, заполненную ионообменником, насыщенным аммиаком меди $\text{Cu}(\text{NH}_3)_2^{2+}$.

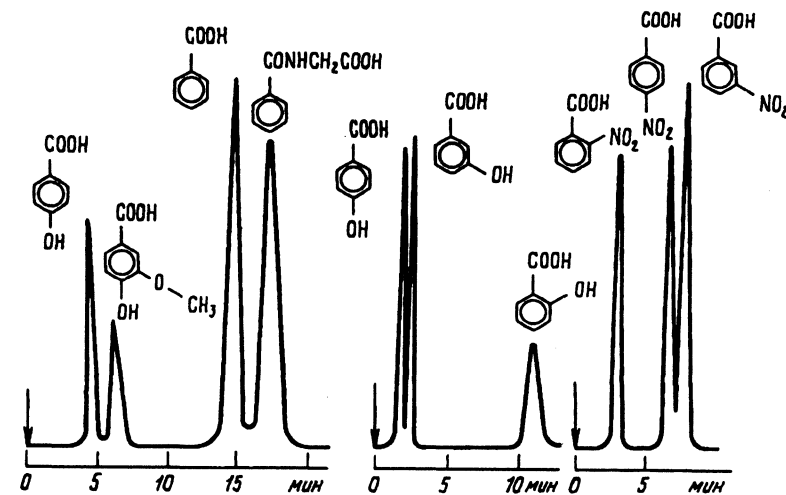


Рис. 8.29. Хроматограммы ароматических кислот, полученные на колонке размером $20 \times 0,4$ см с силикагелем КСК-2 с привитой алкильной цепью C_{16} при 50°C , элюент вода—изопропанол-ТБА ($95:5:2 \cdot 10^{-3}$)

8.7.4. Эксклюзионная хроматография

Эксклюзионная хроматография — это разновидность жидкостной хроматографии, в которой разделение компонентов основано на распределении молекул в соответствии с их размером между растворителем, находящимся в порах сорбента, и растворителем, протекающим между его частицами. В процессе разделения небольшие молекулы попадают в сетку полимера, в порах которой растворитель служит неподвижной фазой, и удерживаются там, большие молекулы не могут проникнуть в полимерную сетку и вымываются из колонки подвижной фазой (рис. 8.30). Вначале элюируются самые большие, затем средние и потом небольшие молекулы (рис. 8.31). Поэтому эксклюзионную хроматографию называют также молекулярно-ситовой. Эксклюзионная хроматография подразделяется на гель-проникающую и гель-фильтрационную. В гель-проникающей хроматографии разделение осуществляется на полимерах, набухающих в органических растворителях; если же полимеры набухают в воде, то обычно говорят о гель-фильтрационном варианте.

Удерживание молекул в эксклюзионной хроматографии определяется их диффузией в поры сорбента и зависит как от размера молекул, так и от размера пор неподвижной фазы. Если на механизм такого распределения молекул не накладываются другие побочные эффекты, например адсорбция или ионный обмен, то изотерма

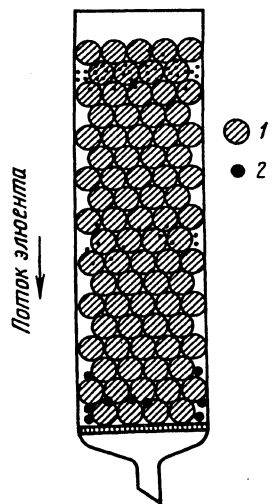


Рис. 8.30. Промежуточная стадия элюирования из колонки в эксклюзионной хроматографии: 1 — зерна пористого сорбента; 2 — разделяемые молекулы различного размера

распределения линейна (т. е. концентрация в неподвижной фазе всегда пропорциональна концентрации в подвижной фазе) и хроматограммы имеют форму кривой Гаусса.

В этом варианте жидкостной хроматографии коэффициент распределения D равен 1, так как подвижная фаза и неподвижная фаза, в порах которой находится тот же растворитель, имеют одинаковый состав. Это условие соблюдается для самых маленьких молекул, которые движутся через колонку медленнее.

Основное уравнение колоночной хроматографии $V_R = V_m + DV_s$ при $D = 1$ приобретает вид

$$V_R = V_m + V_s.$$

Из этого уравнения ясно, что объем элюирования растворенного вещества с малыми размерами молекул складывается из свободного объема колонки V_m и объема растворителя, заключенного в порах неподвижной фазы V_s . Молекулы большого размера, не попадающие в поры неподвижной фазы, элюируются из колонки вместе с подвижной фазой, для них $D = 0$, а $V_R = V_m$.

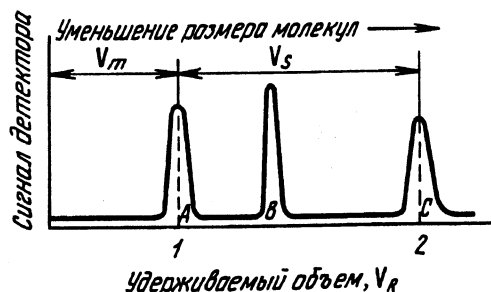


Рис. 8.31. Характерная эксклюзионная хроматограмма: пик А соответствует крупным молекулам, не проникающим в поры; пик С — малым молекулам, способным свободно диффундировать через пористый материал

Такой диапазон значений D (от 0 до 1) характерен только для эксклюзионной хроматографии.

Все молекулы анализируемой смеси должны вымываться из колонки при пропускании небольшого объема растворителя от V_m до $V_m + V_s$ и разделение заканчивается до выхода пика растворителя. Поэтому в этом виде хроматографии всегда нужно использовать довольно длинные колонки с большим свободным объемом колонки V_m и большим числом пор в сорбенте.

При анализе многокомпонентных смесей часто используют две, иногда четыре последовательно соединенные колонки.

При использовании градиентного элюирования смесями растворителей разрешение пиков на хроматограмме улучшается. Параметр емкости

$k = D \frac{V_s}{V_m}$ в эксклюзионной хроматографии обычно не используют, так как

для большинства современных сорбентов $V_m \sim V_s$, $k = D$.

Каждый сорбент характеризуется объемом пор, следовательно, областью разделяемых молекулярных масс и градуировочным графиком. Градуировочный график в этом варианте хроматографии имеет сложный вид, характеризующий зависимость удерживаемого объема от молекулярной массы или размера молекул. Связь между удерживаемым объемом и молекулярной массой разделяемых полистиролов показана на рис. 8.32. Молекулы с массой $2,6 \cdot 10^6$ — $1 \cdot 10^6$ не удерживаются в порах сорбента и вымываются растворителем, объем которого равен свободному объему колонки V_m (участок на графике обозначен V_m). Молекулы с массой $\leq 1 \cdot 10^5$ проникают в поры неподвижной фазы и элюируются объемом растворителя, который соответствует его доле в порах сорбента V_s (участок на кривой обозначен B). Все компоненты при $D = 1$ должны элюироваться в пределах определенного объема V_R .

Отрезки A и B — это диапазон селек-

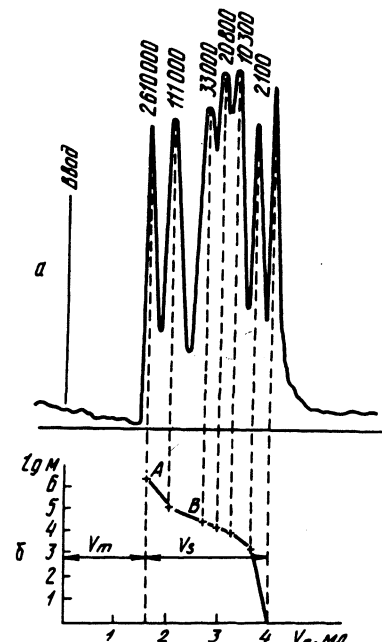


Рис. 8.32. Разделение полистиролов различной молекулярной массы (от 2100 до $2,6 \cdot 10^6$) в бензоле: а — хроматограмма; б — градуировочный график

тивного разделения, т. е. линейные участки градуировочного графика, построенного в координатах $\lg M - V_R$. Надо подбирать сорбент и длину колонки такими, чтобы разделение полистирола протекало в пределах линейного участка градуировочного графика.

Особенность эксклюзионной хроматографии — заранее известная продолжительность анализа в конкретной системе, выход всех компонентов пробы за достаточно короткое время, соответствующее $V_m + V_s$.

Неподвижные фазы в эксклюзионной хроматографии выбирают для решения конкретной аналитической задачи. Первоначально устанавливают, какая система растворителей может быть использована для анализа (водная или водно-органическая), что и определяет тип сорбента. Так, например, разделение водных смесей проводят на сшитых декстранах (сефадекс) или полиакриламиде (биогель Р). С органическими растворителями разделение проводят на гидрофобных полистиролах с различной степенью сшивки (стирогель, поргель, биобид С). Подобные гидрофобные гели обладают хорошей разделяющей способностью только в том случае, если полимер набухает в органическом растворителе. Такие набухшие гели неустойчивы к давлению, скорость потока очень низка. Для эксклюзионной хроматографии при высоких давлениях колонки заполняют устойчивыми к давлению неподвижными фазами с жесткими матрицами — силикагелями. Недостаток таких сорбентов — высокая адсорбционная активность, которую можно подавить силанизацией поверхности либо выбором подходящего по полярности элюента (см. разд. 8.7.1). Например, используя в качестве подвижной фазы метиленхлорид или тетрагидрофуран, на силикагеле можно разделить по молекулярным массам полистиролы.

Подвижные фазы в эксклюзионной хроматографии должны удовлетворять определенным требованиям, главные из них — полное растворение образца, хорошее смачивание сорбента, предотвращение адсорбции, низкая вязкость и токсичность. При анализе поливиниловых спиртов в качестве подвижной фазы часто используют тетрагидрофуран, при анализе полиэлектролитов — воду.

8.7.5. Применение ВЭЖХ

Интерес к ВЭЖХ обусловлен такими достоинствами метода, как универсальность, возможность автоматизации разделения и анализа сложных смесей органических и неорганических веществ, экспрессность, эффективность и высокая чувствительность. Интенсивно развиваются все варианты ВЭЖХ, области применения их разнообразны (табл. 8.4). Метод адсорбционной ВЭЖХ, как и газовая хроматография, — это серийный метод определения органических соединений многих классов, его широко используют при анализе смесей аминокислот, белков, лекарственных препаратов.

Таблица 8.4. Применение различных видов ВЭЖХ для разделения органических соединений

Метод хроматографии	Соединение	Сорбент	Подвижная фаза
Адсорбционная	Углеводороды (загрязняющие атмосферу) Полициклические углеводороды (карбазол, пирен, фенантрен, нафталин и др.) Пластификаторы (фталаты, добавляемые в полимеры для их пластичности) Пластификаторы	Оксид алюминия	Циклогексан
		Оксид алюминия	n-Пентан–диэтиловый эфир (градиентное элюирование)
		Силикагель	Изооктан
Распределительная	Углеводороды (входящие в состав бензина) Пестициды (ДДТ и др.) Ароматические углеводороды и кислоты Стероиды (стероидные гормоны насекомых) Аминокислоты	Порасил- C ₁₈ (с химически привитым октадецилсиланом)	Метанол–вода (1:1)
		Силикагель + 30% карбовакс-600	Изооктан
		Силикагель- C ₁₈	Вода
Ионообменная	Наркотические и болеутоляющие средства Фторированные углеводороды Компоненты вазелинового масла	Силикагель- C ₁₆	Изопропанол–вода (1:4)
		Поргель-PN	Метанол–вода (7:3)
		Сульфокатионообменник	Цитрат натрия pH 3–5 (градиентное элюирование) Буфер pH 9,0
Ион-парная	Красители, сульфокислоты Амины	Анионообменник	Этанол–вода
		Дауэкс 1	Цитрат натрия (градиентное элюирование) Метанол, pH 2–4, противоион (C ₄ H ₉) ₄ N ⁺
		Анионообменник	0,1 М HClO ₄ – ацетонитрил

Метод хроматографии	Соединение	Сорбент	Подвижная фаза
Эксклюзионная	Фенолы и их производные	Сефадекс (гель декстрана)	Вода
	Белки	Сефадекс G-100	0,5 М NaCl, pH 8
	Пептиды (в биологических жидкостях)	Сефадекс	0,3 М $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ — мочевины, pH 6,0~
	Полисахариды (декстраны M_n -1000-7000)	Сефадекс G-100	Вода

В неорганическом анализе ВЭЖХ применяют значительно реже, чем в органическом, хотя при определении следов металлов этот метод может быть весьма полезен, особенно при использовании селективных и высокочувствительных детекторов.

Метод распределительной хроматографии с успехом применяют для разделения сильнополярных соединений, аминокислот, фенолов, фенилкарбоновых кислот. Примеры высокoeffективных разделений методами ионообменной, ионной и ион-парной хроматографии приведены в п. 8.7.3.

Эксклюзионную хроматографию широко используют при исследовании полимеров, определении их молекулярных масс, а также в биологии и медицине для анализа белков, крови и других объектов. Этот метод удобен для исследования образцов неизвестного состава, так как можно не опасаться нежелательных превращений веществ в колонках. Метод эксклюзионной хроматографии можно использовать и в неорганическом анализе. Например, при помощи некоторых природных цеолитов можно разделить ионы в зависимости от их размера. Гидратированные ионы или многоатомные частицы не могут проникнуть в поры цеолита, их легко отделить от ионов малого размера, проникающих в матрицу цеолита.

Таким образом, развитие и широкое внедрение методов ВЭЖХ в практику позволяет решить самые актуальные задачи.

8.7.6. Особенности жидкостных хроматографов

Жидкостной хроматограф — более сложный прибор по сравнению с газовым (см. рис. 8.8). 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

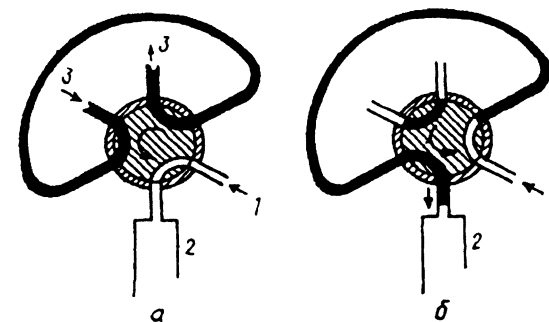


Рис. 8.33. Шестиходовой кран с петлей для образца: а — заполнение петли образцом; б — перевод образца в колонку; 1 — элюент; 2 — колонка; 3 — образец

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 (рис. 8.33) или специальные микрошприцы. Пробу вводят через прокладку из специальных ненабухающих полимерных материалов (рис. 8.34). 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 меньше, чтобы избежать внеколоночного размытия хроматографической полосы.

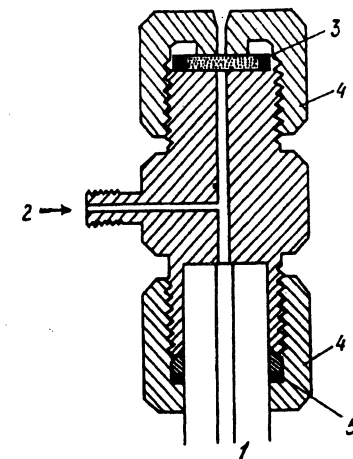


Рис. 8.34. Колонка с системой ввода: 1 — колонка; 2 — элюент; 3 — прокладка; 4 — гайка; 5 — уплотнение

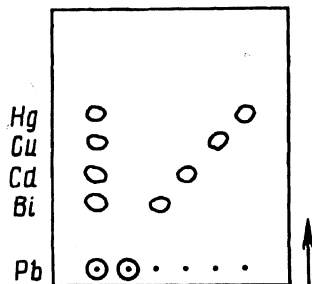


Рис. 8.36. Разделение диэтилди-тиокарбаминатов металлов методом ТСХ:

неподвижная фаза — силикагель; подвижная фаза — *n*-гексан—хлороформ—диэтиламин (20:2:1, по объему). Значения R_f : Pb — 0,00; Bi — 0,27; Cd — 0,34; Cu — 0,44; Hg — 0,56

сорбенты (оксид алюминия, силикагель, целлюлозу и др.), нанесенные на пластинку тонким слоем. В обоих методах используют хроматографические системы жидкость—твёрдый сорбент и жидкость—жидкость—твёрдый 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) (рис. 8.36), 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 (рис. 8.37): $R_f = \frac{x_1}{L}$. В соответствии с определением R_f всегда $\leq 1,00$. Ве-

личина 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, температу-

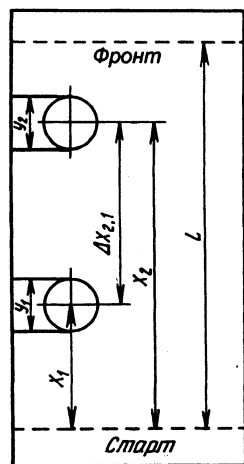


Рис. 8.37. Схема тонкослойной (бумажной) хроматографии

ры 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_i 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:

$$D = \frac{V_m}{V_s} \left(\frac{1}{R_f} - 1 \right).$$

Это следует из того, что существует определенная связь между основными параметрами удерживания в ТСХ и в колоночной хроматографии:

$$R_f = k_f \frac{t_m}{t_s},$$

где k_f — коэффициент перехода от жидкостной колоночной хроматографии к тонкослойной, который рассчитывают из соотношения

$$k_f = \frac{(V_s/V_m)_{\text{ЖКХ}}}{(V_s/V_m)_{\text{ТСХ}}}. \quad (8.36)$$

При $k_f = 1$ уравнение (8.36) принимает вид

$$V_s/V_m = 1/R_{f\text{ТСХ}} - 1.$$

Число теоретических тарелок рассчитывают по формуле

$$N = 16 \left(\frac{x}{y} \right)^2,$$

в этом случае $x = t_R$, $y = w$ (см. рис. 8.37).

Мерой эффективности разделения на бумаге или в тонком слое, как и в колоночной хроматографии, является величина H :

$$H = \frac{L}{N} = \frac{L}{16} \left(\frac{y}{x} \right)^2.$$

Критерий разделения определяют исходя из хроматограммы по формуле

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

где индексы 1,2 — номера компонентов. Разделение двух веществ с R_{f1} и R_{f2} практически возможно, если $R_{f1} > R_{f2}$ и $\Delta R_f \geq 0,1$. В случае адсорбционной ТСХ величина R_f описывается уравнением

$$R_f = \left[1 + k + A_t \varphi V_s \frac{V_s}{V_m} + D \frac{V_s}{V_m} \right]^{-1},$$

где k — коэффициент адсорбции; A_t — площадь твердого носителя на единицу объема неподвижной фазы; φ — энергия взаимодействия двух молекул.

Эффективность выбранного варианта ТСХ (адсорбционного, распределительного, ионообменного) и хроматографической системы можно оценить по фактору разделения (селективности) двух веществ с разными коэффициентами распределения:

$$\alpha = \frac{D_2}{D_1} = \frac{(1/R_{f2} - 1)}{(1/R_{f1} - 1)}.$$

Получение и анализ плоскостных хроматограмм. На полоске хроматографической бумаги или на тонком слое сорбента проводят острым карандашом стартовую линию на расстоянии 1 см от нижнего края бумаги (пластинки). Пробу наносят микропипеткой на линию старта. Диаметр пятна

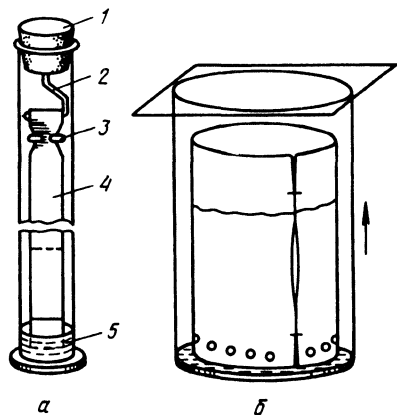


Рис. 8.38. Камера для получения восходящих одномерной (а) и двухмерной (б) хроматограмм:

1 — пробка; 2 — крючок; 3 — зажим; 4 — полоска бумаги; 5 — растворитель

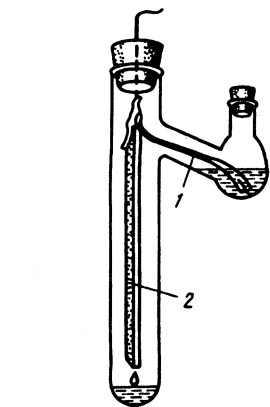


Рис. 8.39. Прибор для получения нисходящей хроматограммы на закрепленном слое:

1 — полоска фильтровальной бумаги; 2 — пластинка для ТСХ

не должен превышать 2—3 мм; чем меньше пятно, тем лучше разделение. На рис. 8.38 показаны различные способы получения восходящих хроматограмм на бумаге. Иногда получают нисходящие (рис. 8.39) или круговые хроматограммы. Наиболее эффективный способ получения четких хроматограмм на бумаге — это получение двухмерных хроматограмм. Принцип двухмерной хроматограммы аналогичен повторному разделению. Этот метод особенно эффективен, когда смесь веществ не удается разделить в одном растворителе. Поэтому проводят повторное разделение в направлении, перпендикулярном первоначальному, с использованием другого растворителя, для которого исследуемые вещества имеют различные коэффициенты распределения. В этом случае применяют большие листы бумаги размером, например, 20×25, 30×35 см, в зависимости от размера стакана, камеры, герметично закрытой крышкой, в которую помещен растворитель.

В ТСХ чаще используют восходящий способ получения хроматограмм. Для этого применяют стеклянные, металлические или пластмассовые пластинки, покрытые тонким слоем сорбента (неподвижная фаза) обычно толщиной 100—300 мкм. Исследуемое вещество наносят микропипеткой на стартовую линию, как в БХ, и помещают пластинку в камеру, содержащую растворители (подвижная фаза) для разделения компонентов.

Хроматографирование в БХ и ТСХ продолжают до тех пор, пока растворитель не пройдет от линии старта ~10 см. После этого хроматограмму вынимают из камеры и подсушивают на воздухе. Если образуются невидимые зоны, хроматограммы проявляют.

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 анализируе-

А		Б	
И	И	И	И
1	О	О	1
2	О	О	11
3	О	О	10
5	О	О	5
4	О	О	12
6	О	О	6
		О	13
7	О	О	14
8	О	О	15
9	О	О	

Рис. 8.40. Хроматограмма стандартных смесей (А и Б) аминокислот в системе растворителей *n*-бутанол—пиридин—уксусная кислота—вода (60:40:12:48):

1 — цистеиновая кислота; 2 — лизин; 3 — аргинин; 4 — серин; 5 — глутаминовая кислота; 6 — аланин; 7 — тирозин; 8 — фенилаланин; 9 — лейцин; 10 — гистидин; 11 — аспарагиновая кислота; 12 — треонин; 13 — пролин; 14 — валин; 15 — изолейцин

мой пробы. Примеры реагентов-проявителей для различных классов органических соединений приведены в табл. 8.5

Для обнаружения аминокислот и пептидов применяют нингидрин. Сухую хроматограмму (рис. 8.40) погружают в раствор нингидрина в ацетоне, обычно 0,2%-ный (при этом достигается однородное покрытие бумаги реагентом), 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.

Т а б л и ц а 8.5. Реагенты для определения (проявления) некоторых органических соединений

Класс соединений	Реагент	Окраска пятен
Кислоты	Бромкрезоловый зеленый	Зеленое пятно на зеленом фоне
Спирты	Нитрат церия-аммония	Коричневое пятно на желтом фоне
	8-Оксихинолилат ванадия (V)	Красное пятно на зеленом фоне
Альдегиды	2,4-Динитрофенилгидразин	От желтого до красного на бледно-оранжевом фоне
Амины	Тиоцианат кобальта	Голубое пятно на розово-белом фоне
Фенолы	Хлорид железа (III)	Красно-фиолетовая

Примеры реагентов, используемых в качестве проявителей для неорганических ионов в методе ТСХ, приведены в табл. 8.6. Кроме того, например, при разделении смеси железа (III), меди (II) и цинка на бумаге или методом ТСХ хроматограммы проявляют раствором гексацианоферрата (II) калия. Образуются окрашенные зоны: синяя — для Fe^{3+} , коричневая — для Cu^{2+} и белая на красноватом фоне — для Zn^{2+} . При использовании радиоактивных изотопов метод позволяет обнаруживать те или иные элементы в очень малой пробе.

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 рас-

творов. Сопоставляя их, делают заключение о наличии в исследуемом растворе тех или иных компонентов. В табл. 8.6 и 8.7 приведены значения R_f для некоторых органических и неорганических соединений в различных растворителях на бумаге и в тонком слое сорбента.

Т а б л и ц а 8.6. Подвижные фазы, проявители, величины R_f некоторых катионов при разделении на микрокристаллической целлюлозе методом ТСХ

Катион	Подвижная фаза, %	Проявитель	R_f
Hg(I)	n-Бутанол—вода (85:15); pH 3,0 (CH_3COOH)	Водный раствор K_2CrO_4	0,13
Ag(I)		То же	0,11
Pb(II)		»	0,05
Ag(I)	n-Бутанол—вода (85:15); pH 2,1 (CH_3COOH)	»	0,14
Hg(I)		»	0,12
Pb(II)		»	0,10
Hg(II)	Этанол—5 М HCl (90:10)	H_2S	0,97
Cd(II)		»	0,93
Bi(III)		»	0,98
Cu(II)	n-Бутанол—2 М HNO_3 — ацетилацетон (49,5:49,5:1)	»	0,94
Sn(II)		»	0,82
Sb(III)		»	0,74
As(III)		»	0,74
Zn(II)	Этанол—5 М HCl (90:10)	Дитизон	0,93
Fe(III)		Самоидентификация	0,80
Co(II)		1-Нитрозо-2-нафтол	0,33
Ni(II)		Диметилглиоксим	0,33
Ca(II)	Изопропанол — H_2O — 1 М HCl (40:20:20)	Ализарин	0,73
Sr(II)		Родизонат калия	0,66
Ba(II)		Родизонат калия	0,55

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-абсорбционными 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 использовании спектрофотометрических методов анализа не превышают 1%.

Таблица 8.7. Величины R_f некоторых двухосновных карбоновых кислот и оксикислот

Кислота	<i>n</i> -Пропанол-конц. аммиак (6:4)	<i>n</i> -Бутилацетат, насыщенный водой	Тетрахлорметан—уксусная кислота (50:1)
Щавелевая	—	0,18	—
Малоновая	0,23	0,25	—
Янтарная	0,30	0,31	0,02
Глутаровая	0,34	0,48	0,03
Адипиновая	0,39	0,63	0,09
Пимелиновая	—	0,77	0,24
Пробковая	0,49	0,87	0,42
Азелаиновая	0,58	0,80	0,66
Себацಿನовая	0,65	0,93	0,80
Гликолевая	0,39	0,13	—
Молочная	0,48	0,24	—
Глицериновая	0,38	—	—
Яблочная	0,19	0,06	—
Винная	0,15	0,01	—
Фумаровая	0,23	0,07	—
Малеиновая	0,21	0,34	—
Глиоксиловая	—	0,02	—

Современное состояние и перспективы. В настоящее время плоскостная хроматография, главным образом ТСХ, интенсивно развивается. Представляется важным развитие радиальной тонкослойной хроматографии: растворитель с регулируемой скоростью подается в центр пластины, заставляя зоны перемещаться от центра к периферии. Оказалось, что существенно ускоряется процесс разделения (1—4 мин) сложной смеси и для этого достаточно иметь пластины со слоем сорбента длиной 20—25 мм. За счет создания принудительного движения подвижной фазы с регулируемой скоростью, уменьшения размера частиц и насыщения пространства над пластиной парами растворителя удалось существенно ускорить процесс и повысить четкость разделения. Возможно использование пластины (аналогично колонке в ЖХ), через которую непрерывно проходит поток подвижной фазы; после детектирования дается качественная и количественная оценки результатов анализа в тонком слое сорбента.

Создан экспрессный ультрачувствительный вариант ТСХ, названный микротонкослойной хроматографией. Его основные преимущества — уменьшение времени анализа, минимальное размывание пятен, максимальная чувствительность — обусловлены использованием сорбентов зернением 2—5 мкм, снижением пробега элюента до 5 см, использованием пластинок размером 6×6 см с толщиной слоя 150—200 мкм. Примеры разделения катионов этим методом см. табл. 8.6. Этим методом можно определять следовые количества токсичных элементов в воде, отходах, а потому он с успехом используется при анализе объектов окружающей среды.

Создан ТСХ-анализатор, позволяющий после разделения автоматически извлекать компоненты прямо из слоя сорбента на пластинке для последующего определения. Этот компактный прибор выпускается промышленностью для массовых анализов. Начинают использовать ЭВМ в сложной детектирующей системе, а также изменение температуры вдоль хроматографической пластины, градиентное элюирование в процессе разделения и т. д. Применение компьютеров позволяет создать экспрессный и высокоточный методы высокоэффективной ТСХ (ВЭТСХ), полностью автоматизировать процесс детектирования с использованием специально составленных программ. Так, с помощью автоматизированного прибора для ТСХ удалось одновременно проявить 32 вещества на пластине размером 10×10 см (метод микроТСХ). ТСХ широко используют для идентификации компонентов лекарств, биохимических препаратов, неорганических веществ.

Таким образом, БХ и ТСХ — простые хроматографические методы для разделения не слишком сложных смесей. В более сложных случаях становятся очевидными ограничения этих методов и тогда используют метод ВЭЖХ. Тем не менее набор инструментов для ТСХ должен входить в стандартное оборудование любой современной аналитической лаборатории.

Вопросы

1. В чем преимущества элюентной хроматографии перед фронтальной и вытеснительной?
2. Почему предпочитают использовать величину исправленного объема удерживания, а не удерживаемого объема?
3. Какие величины характеризуют эффективность хроматографической колонки? Как ее повысить?
4. Как оценивают эффективность разделения в хроматографии?
5. Почему выражение $V'_R = DV_s$ считают основным уравнением хроматографии?
6. Какие числовые значения может принимать величина H ? Каково теоретически минимальное значение?

7. Объясните, почему при больших объемах элюирования хроматографические пики получаются низкими и широкими.
8. Найдите длину хроматографической колонки, если $H = 0,1$ мм, а $N = 10000$.
9. Как влияет скорость потока на эффективность хроматографической колонки?
10. Постройте график зависимости величины H от скорости потока в газовой и жидкостной хроматографии.
11. Предложите практические рекомендации для успешного разделения двух веществ исходя из теории теоретических тарелок, кинетической теории и основного уравнения хроматографии $V'_R = DV_s$.
12. Почему нежелательны слишком высокие и очень низкие значения коэффициентов распределения?
13. Площадь перекрывания пиков двух веществ с равными концентрациями при $R_s = 1,0$ составляет ~2% от их общей площади: при каком значении R_s перекрывание уменьшится до ~0,1%?
14. В каких случаях можно добиться удовлетворительного разделения двух веществ, если $\alpha \leq 1,1$ или $-\alpha \geq 5$?
15. Какие хроматографические условия надо менять, чтобы уменьшить вклад в величину H трех составляющих уравнения Ван-Деемтера?
16. Какие хроматографические параметры можно использовать для идентификации компонентов смеси?
17. Укажите возможности и ограничения разных количественных методов хроматографического анализа.
18. Назовите источники систематических погрешностей при хроматографических определениях.
19. Какие вещества обычно служат образцами сравнения при определении индекса Ковача?
20. Почему результаты идентификации веществ более надежны, если использовать индексы удерживания, а не удерживаемый объем?
21. При анализе смеси из трех компонентов методом газожидкостной хроматографии два оператора независимо друг от друга получили хроматограммы. Как подтвердить наличие одинаковых компонентов в смесях по полученным хроматограммам? Как оформляют хроматограммы и какие данные должны быть в подписях к ним?
22. Что такое градиентное элюирование, какое оно дает преимущество?
23. Предложите условия разделения n -углеводородов и ароматических соединений методом газожидкостной хроматографии. Какие неподвижные фазы и максимальные рабочие температуры нужно рекомендовать?
24. Как вы относитесь к следующему утверждению: газожидкостная хроматография — один из лучших хроматографических методов анализа неорганических веществ? Ответ поясните.
25. Какой детектор вы выбрали бы при анализе объектов окружающей среды на содержание пестицидов? Укажите условия приготовления образца и проведения газохроматографического разделения.
26. Какова роль основных узлов в газовом и жидкостном хроматографах высокого давления? Что общего и каковы принципиальные отличия?
27. Сравните роль подвижных фаз в газожидкостной и жидкостной хроматографии.
28. Какова роль полярности подвижной фазы при разделении органических соединений, например при разделении изомеров бензола?
29. Какой вариант высокоэффективной жидкостной хроматографии вы выбрали бы при разделении аминов, спиртов, n -углеводородов; нормально- или обращенно-фазовый? Предложите схему хроматографического разделения.
30. Предложите условия хроматографического разделения смесей: 1) аминокислот; 2) $Al(III)$, $Co(II)$, $Fe(III)$, $Cu(II)$; 3) Na^+ , K^+ и Ca^{2+} методами ионообменной и ионной хроматографии.
31. В чем разница между химически модифицированными и динамически модифицированными сорбентами? Роль модификаторов? Приведите примеры.
32. Какими детекторами надо пользоваться в ионообменной, ионной и ион-парной хроматографии при разделении органических и неорганических веществ?
33. Что такое программирование температуры, почему оно позволяет улучшать разделение?
34. Какова последовательность элюирования C_6H_{14} , $C_{10}H_{22}$ и $C_{14}H_{30}$ в условиях высокоэффективной жидкостной хроматографии с нормальными и обращенными стационарными фазами?
35. Каковы преимущества двухмерной хроматографии перед простой одномерной бумажной или ТСХ?
36. Как идентифицировать пятна органических соединений в методе ТСХ?
37. Как выполняют количественный анализ в методе ТСХ?
38. Назовите перспективные хроматографические методы. Каковы пути их развития?

- внутренняя 268
 - способы получения 268
 Хроматография 265
 - адсорбционно-комплексобразовательная 268
 - вытеснительная 270
 - газовая 267, 295
 - - пиролизная 302
 - - реакционная 302
 - - сверхкритическая флюидная 302
 - жидкостная 267, 306
 - - ионная 313, 320
 - - ион-парная 313, 321
 - - колоночная 268
 - - лигандообменная 322
 - - механизм удерживания 311
 - - нормально-фазовая 312
 - - обращенно-фазовая 313
 - - плоскостная 331
 - - распределительная 312
 - - эксклюзионная 323
 - колоночная 268
 - плоскостная 268
 - элюентная 268
 - фронтальная 270
 Хромофорные группы 166
 Цементация 252
 Число координационное максимальное 139
 - степеней свободы 46
 - - характеристическое 139

Чувствительность 25
 Эквивалент 23
 Эквивалентности фактор 23
 Экстрагент 217
 - кислотный 227
 - нейтральный 227
 - основной 227
 Экстракт 217
 Экстракция 216
 - непрерывная 234
 - периодическая 233
 - противоточная 234
 Электродиализ 262
 Электролиз 252
 Электрофорез 254
 Элюат 268
 Элюент 268
 Элюирование градиентное 269
 - изократическое 269
 Элюотропный ряд 310
 Энергия внешняя 80
 - внутренняя 80
 - свободная 81
 - связанная 81
 Энтальпия 81
 Энтропия 81
 Эффект макроциклический 142
 - растворителя дифференцирующий 123
 - - нивелирующий 123
 - стерический 157
 - хелатный 153
 Эффективность колонки 275

Оглавление

Предисловие	3
Глава 1. Введение	4
1.1. Общие замечания	4
1.2. Аналитическая служба как наука	5
1.2.1. Структура современной аналитической химии	6
1.2.2. Методы аналитической химии	8
1.3. Аналитическая служба. Значение и области использования химического анализа	9
1.4. Методологические аспекты аналитической химии	11
1.5. Краткий исторический очерк	13
Глава 2. Метрологические основы аналитической химии	21
2.1. Единицы количества вещества и способы выражения концентраций	21
2.2. Выбор метода анализа	24
2.3. Аналитический сигнал. Измерение	30
2.4. Погрешности химического анализа. Обработка результатов измерений	35
2.4.1. Систематические погрешности	37
2.4.2. Случайные погрешности	42
2.5. Предел обнаружения. Диапазон определяемых содержаний	54
2.6. Значащие цифры и правила округления	55
Вопросы	57
Глава 3. Отбор и подготовка пробы к анализу	59
3.1. Отбор пробы	59
3.2. Подготовка пробы к анализу	67
Вопросы	78
Глава 4. Термодинамика и кинетика химических реакций и процессов	79
4.1. Термодинамика процессов и реакций	79
4.1.1. Термодинамические функции состояния	80
4.1.2. Химическое равновесие	82
4.2. Скорость реакций	85
Вопросы	94
Глава 5. Химическое равновесие в реальных системах	96
5.1. Факторы, влияющие на равновесие в реальных системах	96
5.2. Сольватационные эффекты	97

5.3. Учет электростатических взаимодействий. Коэффициенты активности	99
5.4. Учет химических взаимодействий	103
5.5. Термодинамическая и концентрационные (реальные и условные) константы равновесий	105
5.6. Общий подход к расчетам равновесных составов химических систем	107
5.7. Графическое описание равновесий	111
Вопросы	115
Глава 6. Основные типы химических реакций, используемых в аналитической химии	117
6.1. Кисотно-основное равновесие	117
6.1.1. Протолитическая теория	119
6.1.2. Сила кислот и оснований	121
6.1.3. Нивелирующий и дифференцирующий эффекты растворителей	123
6.1.4. Расчет pH	125
6.1.5. Буферные растворы	130
6.1.6. Взаимодействие кислоты и основания	137
6.1.7. Механизм кислотно-основных реакций	138
6.2. Комплексообразование	138
6.2.1. Основные понятия	138
6.2.2. Типы лигандов	140
6.2.3. Типы комплексов	141
6.2.4. Равновесия реакций комплексообразования	145
6.2.5. Скорость реакций комплексообразования	150
6.2.6. Факторы, влияющие на устойчивость комплексов	151
6.2.7. Некоторые аналитически важные свойства комплексов	159
6.2.8. Органические реагенты	164
6.3. Окислительно-восстановительное равновесие	177
6.3.1. Оценка окислительно-восстановительной способности	177
6.3.2. Уравнение Нернста	181
6.3.3. Влияние химических взаимодействий на потенциал	185
6.3.4. Константы равновесия окислительно-восстановительных реакций	188
6.3.5. Механизм окислительно-восстановительных реакций	190
6.4. Равновесие в системе осадок—раствор	192
6.4.1. Произведение растворимости	192
6.4.2. Растворимость	193
6.4.3. Факторы, влияющие на растворимость	196
Вопросы	203
Глава 7. Методы маскирования, разделения и концентрирования	207
7.1. Маскирование	207
7.2. Разделение и концентрирование	209
7.3. Количественные характеристики разделения и концентрирования	211
7.4. Осаждение и соосаждение	212
7.5. Экстракция	216
7.5.1. Основные законы и количественные характеристики	218

7.5.2. Скорость экстракции	224
7.5.3. Классификация экстракционных процессов	226
7.5.4. Практическое использование экстракции	236
7.6. Сорбция	239
7.6.1. Механизмы сорбции	239
7.6.2. Активные угли	242
7.6.3. Ионообменники и хелатообразующие сорбенты на органической матрице	243
7.6.4. Кремнеземы и химически модифицированные кремнеземы	249
7.6.5. Неорганические сорбенты	251
7.7. Электрохимические методы разделения	252
7.8. Методы испарения	255
7.9. Управляемая кристаллизация	260
7.10. Другие методы разделения и концентрирования	261
Вопросы	263
Глава 8. Хроматографические методы	265
8.1. Классификация хроматографических методов	267
8.2. Способы получения хроматограмм	268
8.3. Хроматографические параметры	270
8.4. Теория хроматографического разделения	273
8.4.1. Теория кинетических тарелок	275
8.4.2. Кинетическая теория хроматографии	277
8.4.3. Оценка размывания хроматографической полосы	280
8.4.4. Селективность и разрешение	282
8.5. Аппаратура и обработка хроматограмм	284
8.5.1. Схема хроматографа	284
8.5.2. Общие сведения о детекторах	285
8.5.3. Анализ и методы расчета хроматограмм	288
8.5.4. Достоверность результатов и источники погрешностей	294
8.6. Газовая хроматография	295
8.6.1. Газотвердофазная хроматография	296
8.6.2. Газожидкостная хроматография	298
8.6.3. Области применения газовой хроматографии	301
8.6.4. Особенности газовых хроматографов	303
8.7. Жидкостная колоночная хроматография	306
8.7.1. Адсорбционная хроматография	307
8.7.2. Распределительная хроматография	312
8.7.3. Ионообменная, ионная, ион-парная хроматография	313
8.7.4. Эксклюзионная хроматография	323
8.7.5. Применение ВЭЖХ	326
8.7.6. Особенности жидкостных хроматографов	328
8.8. Плоскостная хроматография	331
Вопросы	339
Литература	342
Предметный указатель	345