



ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Учебно-методическое пособие

МОСКВА
МФТИ
2017

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Московский физико-технический институт
(государственный университет)»

Департамент молекулярной и биологической физики

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Учебно-методическое пособие

Составители: *С. В. Никулин*
Н. Л. Стародубцева
И. А. Попов

МОСКВА
МФТИ
2017

УДК 535.33
ББК 24.4я73
В93

Рецензент

Кандидат физико-математических наук *А. С. Кононихин*

Высокоэффективная жидкостная хроматография :
В93 учебно-методическое пособие / сост. : С. В. Никулин,
Н. Л. Стародубцева, И. А. Попов. – М. : МФТИ, 2017. – 48 с.

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов МФТИ, изучающих курс «Физические методы исследования». Цель пособия – познакомить обучающихся с методами исследования веществ с помощью жидкостной хроматографии. Пособие содержит методические материалы, которые могут использоваться как в рамках подготовки студентов к семинарским занятиям, так и при выполнении лабораторной работы.

Целями лабораторной работы являются: исследование влияния элюирующей силы растворителя на параметры хроматографического разделения в методе обращенно-фазовой ВЭЖХ, определение оптимальных условий хроматографического разделения смеси веществ в изократическом и градиентном режимах, экспериментальная проверка выполнения уравнения Ван-Деемтера.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография, метод обращенно-фазовой ВЭЖХ, изократический и градиентный режимы, уравнение Ван-Деемтера.

УДК 535.33
ББК 24.4я73

- © Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (государственный университет)», 2017
- © Никулин С.В., Стародубцева Н.Л., Попов И.А., составление, 2017

Содержание

1. Введение	4
2. ФИЗИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ....	9
2.1. Изотермы распределения	9
2.2. Движение молекул по хроматографической колонке	11
2.3. Теория теоретических тарелок	12
2.4. Хроматограмма и хроматографические параметры	19
2.5. Уравнение Ван-Деемтера	23
2.5.1. Продольная диффузия	24
2.5.2. Различие траекторий движения молекул по колонке	25
2.5.3. Сопrotивление массопереносу	26
2.6. Виды сорбентов	30
2.6.1. Нормально-фазовая хроматография	31
2.6.2. Обращенно-фазовая хроматография	32
2.7. Градиентный и изократический режимы разделения	34
2.8. Метод внешнего стандарта или абсолютной калибровки	35
3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ УСТАНОВКА	36
3.1. Основные компоненты хроматографа	36
4. ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ	41
5. ЗАДАНИЯ	42
Определение мертвого времени колонки	42
Модель линейного изменения элюирующей силы растворителя	43
Экспериментальная проверка выполнения уравнения Ван-Деемтера	44
6. ВОПРОСЫ И ЗАДАЧИ	45
Литература	47

1. Введение

Существует много различных определений термина «хроматография». Согласно одним определениям хроматография – это наука, другим – процесс, а третьим – метод [1]. Ниже приведено определение, рекомендованное международным союзом теоретической и прикладной химии (ИЮПАК).

Хроматография – это *физический метод разделения*, в котором разделяемые компоненты распределяются между двумя фазами, одна из которых неподвижна (неподвижная фаза), в то время как другая (подвижная фаза) движется в определенном направлении [2].

Первые работы по хроматографии были выполнены русским ученым Михаилом Семеновичем Цветом в 1899–1901 годах. 21 марта 1903 года на заседании биологического отделения Варшавского общества естествоиспытателей он выступил с лекцией под названием «О новой категории адсорбционных явлений и о применении их к биохимическому анализу». Этот день официально считается днем открытия хроматографии [3, 4].

Адсорбция (по ИЮПАК) – это увеличение концентрации растворенного вещества на поверхности раздела твердой и жидкой фаз в результате действия поверхностных сил. Адсорбция может также происходить на поверхности раздела твердой и газовой фаз.

М. С. Цвет занимался изучением растительных пигментов, в частности, хлорофилла. Он обнаружил способность пигментов адсорбироваться на поверхности различных твердых веществ (всего он протестировал более 100 таких веществ!), причем различные пигменты адсорбировались с разной «силой». Самые хорошие результаты были получены им при использовании мела (карбонат кальция) и инулина (полисахарид). Для своих опытов М. С. Цвет растирал листья в лигроине (лигроин – это смесь различных углеводов, получаемая при перегонке нефти), а затем проводил эксперимент по следующей методике: «Адсорбент в виде тонкого порошка, полученного путем тщательного растирания в совершенно сухой ступке, всыпали в узкогорлую воронку, на кончик которой прикреплялся колпачок из фильтровальной бумаги (рис. 1а). Для изготовления такой воронки нижнюю часть обыкновенной пробирки вытягивали в пламени бунзеновской горелки в узкую шейку (диаметр 1 мм) и на кончик привязывали колпачок из шведской бумаги. Порошок плотно и равномерно тассировался с помощью стеклянной палочки. В воронку с сорбентом непосредственно наливали лигроиновый раствор хлорофилла или же через порошок предварительно пропускали для вытеснения воздуха чистый

лигроин. Фильтрование производили под небольшим положительным или отрицательным давлением» [5].

Результаты своих экспериментов М. С. Цвет описывает следующим образом: «Особенно поучительно наблюдение адсорбционных явлений при фильтрации через порошок. Из нижнего конца воронки вытекает сначала бесцветная, потом желтая (каротин) жидкость, между тем как в поверхностных слоях инулинового столба образуется зелёное кольцо, на нижнем краю которого скоро дифференцируется желтая кайма. При последующем пропускании через инулиновый столб чистого лигроина оба кольца, зелёное и желтое, значительно расширяются и распространяются вниз. В самой зелёной полосе тоже происходит дифференциация, а именно на сине-зеленую нижнюю и желто-зелёную верхнюю зоны» [5].

Позднее М. С. Цвету удалось улучшить разделение растительных пигментов при помощи изменения геометрических размеров колонки и подбора жидкости, используемой в качестве подвижной фазы (рис. 1г).

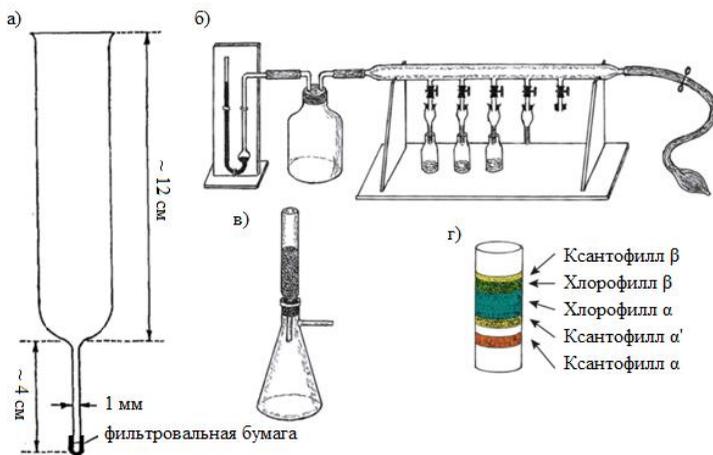


Рис. 1. Эксперименты М. С. Цвета по хроматографии.

- Воронка, использовавшаяся в первых экспериментах М. С. Цвета [6].
- Аппарат для одновременного использования до 5 колонок. Нижняя часть стеклянных воронок (внутренний диаметр 2–3 мм, длина 20–30 мм) использовалась в качестве хроматографической колонки [4].
- Колонка для большого количества образца (внутренний диаметр 1–3 см, длина набитой сорбентом части 5–9 см) [4].
- Хроматографическое разделение растительных пигментов по М. С. Цвету (неподвижная фаза – карбонат кальция, подвижная фаза – сероуглерод) [4]

Сам термин «хроматография» (дословно – «запись цвета») также был предложен М. С. Цветом.

По целому ряду причин жидкостная хроматография, разработанная М. С. Цветом, не получила широкого распространения после публикации им своих работ. В 1941 году британскими учеными Арчером Мартином (Archer Martin) и Ричардом Сингом (Richard Syngé) была опубликована статья, в которой они описали создание нового типа хроматографии – распределительной хроматографии [7]. Мартин и Синг применили новый метод для анализа аминокислот. Основное отличие распределительной хроматографии от адсорбционной заключается в механизме удерживания изучаемых веществ неподвижной фазой. Если в адсорбционной хроматографии они удерживаются за счет адсорбции, то в распределительной хроматографии удержание происходит за счет различной растворимости в подвижной и неподвижной фазах. В оригинальной работе Мартина и Синга в качестве неподвижной фазы использовалась вода, удерживаемая силикагелем, а в качестве подвижной – несмешивающиеся с водой органические растворители (в частности, хлороформ с добавлением 1% бутанола). Стоит отметить, что уже тогда авторами была отмечена возможность использования пара или газа в качестве подвижной фазы, что впоследствии привело к созданию газовой хроматографии.

В своей статье Арчер и Синг также впервые представили теорию хроматографии. За свою работу в 1952 году они были удостоены Нобелевской премии по химии.

Еще одним важным направлением развития жидкостной хроматографии является ионообменная хроматография. Удержание исследуемых веществ (в форме ионов) неподвижной фазой в данном типе хроматографии осуществляется за счет кулоновского взаимодействия разноименно заряженных ионов на поверхности неподвижной фазы и ионов исследуемого вещества.

Впервые ионообменная хроматография появилась в 1938 году и использовалась для разделения изотопов лития и калия [3]. Тогда в качестве неподвижной фазы использовались цеолиты (группа микропористых алюмосиликатных минералов). Примерно в то же время появились и начали использоваться в качестве неподвижной фазы ионообменные смолы (синтетические высокомолекулярные полимеры, содержащие функциональные группы кислотной или основной природы). Ионообменная хроматография также применялась в Манхэттенском проекте для получения в чистом виде больших количеств редкоземельных металлов.

В 1958 году американскими учеными Станфордом Муром (Stanford Moore), Уильямом Стайном (William Stein) и Дарделом

Спакманом (Darrel Spackman) была опубликована статья, описывающая устройство созданного ими аминокислотного анализатора, основанного на ионообменной хроматографии [8]. Этот прибор сыграл ключевую роль во многих последующих открытиях в области биохимии белка. В 1972 году Мур и Стайн были удостоены Нобелевской премии по химии за свои исследования фермента рибонуклеазы, в ходе которых активно применялся созданный ими аминокислотный анализатор.

Несмотря на создание отдельных узкоспециализированных автоматических анализаторов, жидкостная хроматография в 1950-х годах все еще оставалась методом, в основном выполняемым вручную. В то же время на рынке уже начало появляться оборудование для газовой хроматографии. Впервые газовая распределительная хроматография была описана в 1950 году Арчером Мартином и Энтони Джеймсом (Anthony James). Газовая хроматография очень быстро распространилась и стала широко применяться. Среди причин такой популярности можно выделить высокую эффективность разделения и малое время анализа (время анализа одной пробы на жидкостном аминокислотном анализаторе составляло 6 часов, время анализа пробы с помощью газовой распределительной хроматографии могло исчисляться несколькими минутами). Кроме того, газовая хроматография хорошо подходила для применения в нефтехимической промышленности. Теория газовой хроматографии также была быстро дополнена, и появилась возможность предсказывать влияние различных факторов (таких как скорость подвижной фазы, размер частиц сорбента и т.д.) на эффективность хроматографического разделения.

Применение теории газовой хроматографии к жидкостной хроматографии позволило выявить лимитирующий фактор, ограничивающий эффективность жидкостной хроматографии. Таким фактором оказалась диффузия, которая в жидкостях происходит на несколько порядков медленнее, чем в газах. Также стало понятно, что для повышения эффективности разделения и сокращения времени анализа в жидкостной хроматографии необходимо использовать частицы сорбента меньшего диаметра и увеличить скорость движения подвижной фазы. Однако при выполнении этих условий существенно возрастает давление, необходимое для прокачивания жидкости через колонку.

Первый современный жидкостной хроматограф (рис. 2), работающий при высоких давлениях, был разработан венгерско-американским инженером Чабой Хорватом (Csaba Horváth) в 1965 году. Им же было предложено название нового типа хроматографии: «high-performance liquid chromatography» или, сокращенно, HPLC

(в переводе на русский – «высокоэффективная жидкостная хроматография» или ВЭЖХ).

Любой современный жидкостной хроматограф состоит из насоса, прокачивающего подвижную фазу через хроматографическую колонку, детектора, регистрирующего концентрацию исследуемого вещества в элюате (потоке подвижной фазы, выходящим из колонки), а также устройства для ввода пробы. В простейшем случае в качестве устройства для ввода пробы служит специальный клапан, позволяющий вручную при помощи шприца вводить пробу в поток подвижной фазы. Часто в современных устройствах штатив с исследуемыми образцами и клапан ввода пробы объединяются в единое устройство («автосэмплер»), которое позволяет производить анализ в автоматическом режиме.

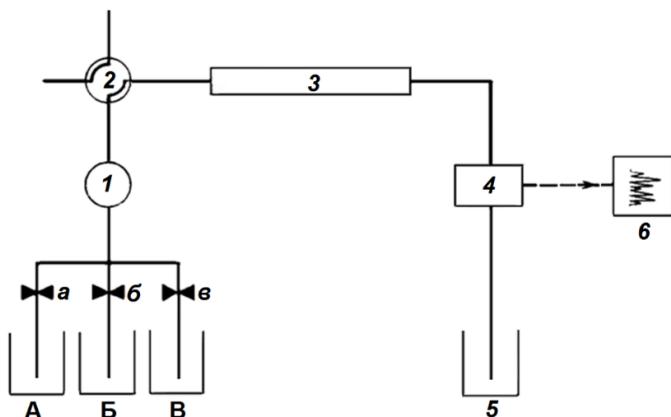


Рис. 2. Принципиальная схема устройства жидкостного хроматографа. А, Б, В – резервуары для растворителя (носителя); а, б, в – дозирующие устройства; 1 – насос; 2 – кран для ввода пробы; 3 – колонка; 4 – детектор; 5 – емкость для элюата; 6 – детектор

Стоит отметить, что с момента изобретения хроматография использовалась для двух различных целей: для анализа состава сложных смесей (аналитическая хроматография) и для получения веществ в чистом виде (препаративная хроматография). На сегодняшний день высокоэффективная жидкостная хроматография, как и классическая колоночная хроматография, широко применяется не только в науке, но и в промышленности.

2. ФИЗИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

2.1. Изотермы распределения

Рассмотрим сначала простой эксперимент, в котором к порошку сорбента добавляется раствор, содержащий вещество, способное удерживаться сорбентом (такие эксперименты проводил М. С. Цвет еще до открытия хроматографии). При этом механизм удерживания может быть различным и представлять собой как адсорбцию, так и растворение в слое жидкости на поверхности сорбента. Процесс захвата молекул сорбентом может быть представлен как обратимая реакция первого порядка, в которой молекулы исследуемого вещества из раствора M_m переходят в связанное с сорбентом состояние M_s и наоборот.

$$M_m \leftrightarrow M_s;$$

$$\frac{dC_m}{dt} = -k_{in} \cdot C_m; \quad \frac{dC_s}{dt} = -k_{out} \cdot C_s, \quad (1)$$

C_m – концентрация молекул исследуемого вещества M в растворе,
 C_s – концентрация молекул исследуемого вещества M в связанном с сорбентом состоянии,

k_{in} – константа скорости перехода молекул исследуемого вещества M в связанное с сорбентом состояние (в частности, константа скорости адсорбции),

k_{out} – константа скорости перехода молекул исследуемого вещества M в свободное состояние (в частности, константа скорости десорбции).

При этом среднее время пребывания τ молекулы исследуемого вещества M в связанном с сорбентом состоянии можно вычислить по формуле (2):

$$\tau = \frac{1}{k_{out}} = \frac{1}{k_{out}^0 \cdot e^{-\frac{Q}{RT}}} = \tau_0 \cdot e^{\frac{Q}{RT}}. \quad (2)$$

Через некоторое время в рассматриваемой системе установится равновесие, то есть поток молекул исследуемого вещества M , переходящих из связанного состояния в раствор, будет равен потоку молекул, переходящих из раствора в связанное с сорбентом состояние:

$$\frac{dC_m}{dt} = \frac{dC_s}{dt}; \quad k_{in} \cdot C_m = k_{out} \cdot C_s; \quad C_s = \frac{k_{in}}{k_{out}} \cdot C_m; \quad (3)$$

$$C_s = K \cdot C_m, \quad (4)$$

где $K = \frac{k_{in}}{k_{out}}$ – константа распределения (зависит от температуры).

Формула (4) называется изотермой распределения (частным случаем изотермы распределения является изотерма адсорбции). Стоит

отметить, что изотерма распределения не всегда является линейной (линейная изотерма распределения называется *изотермой Генри*) и в общем случае записывается в виде

$$C_s = f(C_m), \quad (5)$$

где f – произвольная функция.

Важным частным случаем нелинейной изотермы распределения является *изотерма Ленгмюра*. Если принять во внимание, что количество центров связывания на поверхности сорбента конечно, то процесс захвата молекул сорбентом должен быть представлен как обратимая реакция второго порядка:

$$M_m + Sur \leftrightarrow M_s; \quad \frac{dC_m}{dt} = -k_{in} \cdot C_m \cdot C_{Sur}^f; \quad \frac{dC_s}{dt} = -k_{out} \cdot C_s; \quad (6)$$

$$C_{Sur} = C_{Sur}^f + C_{Sur}^b, \quad (7)$$

C_{Sur}^f – концентрация свободных центров связывания на поверхности сорбента,

C_{Sur}^b – концентрация занятых центров связывания на поверхности сорбента,

C_{Sur} – концентрация центров связывания на поверхности сорбента (является константой):

$$C_{Sur}^b = C_s; \quad \theta = \frac{C_{Sur}^b}{C_{Sur}}, \quad (8)$$

θ – степень заполнения.

Тогда при наступлении равновесия:

$$\frac{dC_m}{dt} = \frac{dC_s}{dt}; \quad k_{in} \cdot C_m \cdot C_{Sur}^f = k_{out} \cdot C_s; \quad (9)$$

$$k_{in} \cdot C_m \cdot C_{Sur} \cdot (1 - \theta) = k_{out} \cdot C_{Sur} \cdot \theta; \quad (10)$$

$$\theta = \frac{K \cdot C_m}{1 + K \cdot C_m}; \quad (11)$$

$$C_s = C_{Sur} \cdot \theta = C_{Sur} \cdot \frac{K \cdot C_m}{1 + K \cdot C_m}. \quad (12)$$

При малых концентрациях исследуемого вещества изотерма Ленгмюра становится близка к линейной изотерме Генри.

В модели Ленгмюра предполагается, что на поверхности сорбента образуется только один слой молекул исследуемого вещества. Однако в некоторых случаях (например, при очень больших концентрациях исследуемого вещества) это предположение не выполняется и наблюдается *полислойная* адсорбция.

На рис. 3 показан качественный вид графиков основных изотерм распределения.

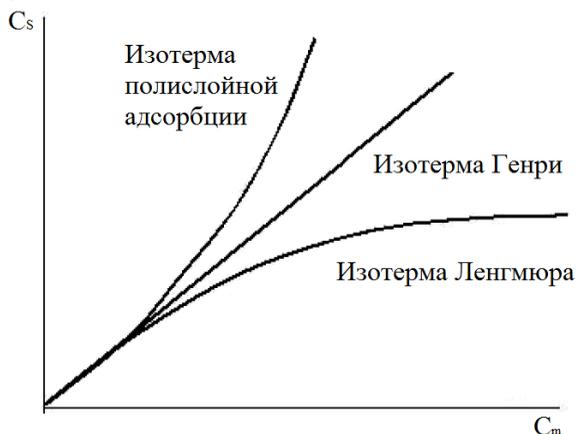


Рис. 3. Основные изотермы распределения

2.2. Движение молекул по хроматографической колонке

В процессе хроматографического разделения жидкость (подвижная фаза) постоянно движется относительно сорбента (неподвижная фаза). При этом каждая молекула исследуемого вещества многократно перераспределяется между подвижной и неподвижной фазой. Находясь в свободном состоянии, молекулы перемещаются по колонке вместе с подвижной фазой. Поскольку средние времена пребывания в связанном состоянии для разных молекул отличаются друг от друга, происходит разделение компонентов смеси веществ.

Рассмотрим подробнее движение одного из компонентов разделяемой смеси (сорбата) по колонке при использовании элюентного способа разделения (рис. 4).

Элюентная хроматография – это хроматографический метод, в котором смесь веществ периодически вводится в поток подвижной фазы и разделяется в колонке на зоны компонентов, выходящих отдельно друг от друга в порядке увеличения их сорбируемости [1]. Кроме элюентной существуют также фронтальная и вытеснительная хроматография, которые применяются значительно реже и поэтому в данной работе обсуждаться не будут.

На рис. 4 представлены кривые зависимости концентрации исследуемого вещества в подвижной (C_m) и неподвижной (C_s) фазах от положения в колонке (ось x направлена вдоль колонки) в определенный момент времени. В дальнейшем будет показано, что в идеальном случае представленные кривые имеют гауссову форму. Если перестать прокачивать подвижную фазу через колонку, то между подвижной и

неподвижной фазой установится равновесие, то есть поток частиц, переходящих из неподвижной фазы в подвижную, будет равен потоку частиц, переходящих из подвижной фазы в неподвижную. Если снова начать прокачивать подвижную фазу через колонку, произойдет смещение профиля концентрации сорбата в подвижной фазе относительно равновесного профиля концентрации в неподвижной фазе. При этом в передней части кривой $C_m(x)$ концентрация сорбата в подвижной фазе становится выше равновесной и начинается переход сорбата в неподвижную фазу. В то же время в задней части кривой $C_m(x)$ концентрация сорбата в подвижной фазе становится ниже равновесной и начинается переход сорбата из неподвижной фазы в подвижную. Таким образом, постоянное движение подвижной фазы препятствует установлению термодинамического равновесия.

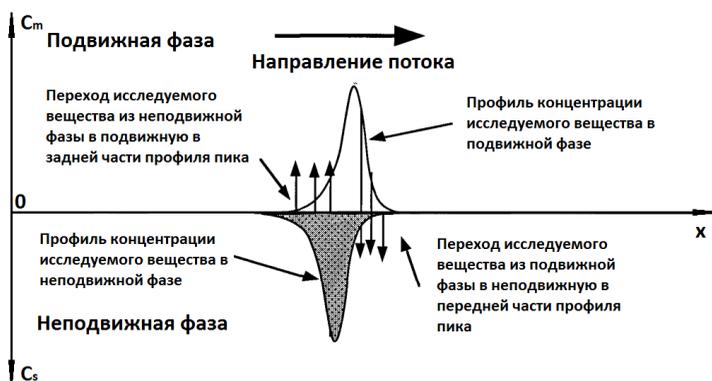


Рис. 4. Движение исследуемого вещества по колонке при использовании элюентного метода разделения [9]

Однако можно считать, что **локально** на небольшом отрезке хроматографической колонки термодинамическое равновесие все же устанавливается. Это предположение лежит в основе теории теоретических тарелок, рассмотренной в следующей части.

2.3. Теория теоретических тарелок

Перед обсуждением теории теоретических тарелок необходимо определить понятие «хроматограмма».

Хроматограмма – это записанная во времени функция концентрации определяемых веществ в подвижной фазе на выходе из колонки [1].

Таким образом, хроматограмма – это график функции $C_m(t)$ на выходе из колонки. Далее, при помощи теории теоретических тарелок будет найден вид функции $C_m(V)$, где V – это объем подвижной фазы, прошедший через колонку, определяемый формулой (13):

$$V = F \cdot t, \quad (13)$$

где F – объемная скорость потока подвижной фазы, t – время.

Зная функцию $C_m(V)$, при помощи замены переменной V на t , легко получить функцию $C_m(t)$.

Как было сказано выше, локально на небольших участках колонки (называемых теоретическими тарелками) успевают установиться термодинамическое равновесие. Длина таких участков называется *высотой эквивалентной теоретической тарелки* (ВЭТТ) и обозначается H . Высота эквивалентной теоретической тарелки вычисляется по формуле (14):

$$H = \frac{L}{N}, \quad (14)$$

где L – длина хроматографической колонки,

N – количество теоретических тарелок.

Рассмотри три последовательные теоретические тарелки (рис. 5).

Тарелка p - 1	Тарелка p	Тарелка p+1
Подвижная фаза V_m $C_{m(p-1)}$	Подвижная фаза V_m $C_{m(p)}$	Подвижная фаза V_m $C_{m(p+1)}$
Неподвижная фаза S $C_{s(p-1)}$	Неподвижная фаза S $C_{s(p)}$	Неподвижная фаза S $C_{s(p+1)}$

Рис. 5. Три последовательные теоретические тарелки [9]

Введем следующие обозначения:

p – номер теоретической тарелки (начинается с 0),

V_m – объем подвижной фазы в каждой теоретической тарелке,

S – площадь поверхности неподвижной фазы в каждой теоретической тарелке,

$N_{m(p)}$ – количество молекул исследуемого вещества в подвижной фазе в теоретической тарелке с номером p ,

$N_{s(p)}$ – количество молекул исследуемого вещества в неподвижной фазе в теоретической тарелке с номером p ,

$N_{t(p)}$ – общее количество молекул исследуемого вещества в теоретической тарелке с номером p ,

$C_{m(p)}$ – концентрация молекул исследуемого вещества в подвижной фазе в теоретической тарелке с номером p ,

$C_{s(p)}$ – концентрация молекул исследуемого вещества на поверхности неподвижной фазы в теоретической тарелке с номером p .

Для теоретической тарелки с номером p выполняются следующие равенства:

$$N_{t(p)} = N_{m(p)} + N_{s(p)}; \quad (15)$$

$$N_{m(p)} = C_{m(p)} \cdot V_m; \quad (16)$$

$$N_{s(p)} = C_{s(p)} \cdot S. \quad (17)$$

Если считать, что равновесие описывается линейной изотермой Генри, то

$$C_{s(p)} = K \cdot C_{m(p)}. \quad (18)$$

В дифференциальной форме:

$$dN_{t(p)} = dN_{m(p)} + dN_{s(p)}; \quad (19)$$

$$dN_{m(p)} = dC_{m(p)} \cdot V_m; \quad (20)$$

$$dN_{s(p)} = dC_{s(p)} \cdot S; \quad (21)$$

$$dC_{s(p)} = K \cdot dC_{m(p)}. \quad (22)$$

Пусть через колонку прошел бесконечно малый объем подвижной фазы dV . Тогда изменение количества молекул исследуемого вещества в теоретической тарелке с номером p можно выразить следующим образом:

$$dN_{t(p)} = C_{m(p-1)} \cdot dV - C_{m(p)} \cdot dV = (C_{m(p-1)} - C_{m(p)}) \cdot dV. \quad (23)$$

По определению, в каждой теоретической тарелке устанавливается термодинамическое равновесие, поэтому изменение количества молекул исследуемого вещества в теоретической тарелке с номером p можно выразить следующим образом:

$$\begin{aligned} dN_{t(p)} &= dN_{m(p)} + dN_{s(p)} = dC_{m(p)} \cdot V_m + dC_{s(p)} \cdot S = \\ &= (V_m + K \cdot S) \cdot dC_{m(p)}. \end{aligned} \quad (24)$$

Из формул (16) и (17) получаем

$$\frac{dC_{m(p)}}{dV} = \frac{C_{m(p-1)} - C_{m(p)}}{V_m + K \cdot S}. \quad (25)$$

Введем новую переменную:

$$v = \frac{V}{V_m + K \cdot S}. \quad (26)$$

Тогда

$$\frac{dC_{m(p)}}{dv} = C_{m(p-1)} - C_{m(p)}. \quad (27)$$

Пусть в начальный момент времени ($t = 0, V = 0$) после введения исследуемого вещества в колонку его концентрация в подвижной фазе в теоретической тарелке с номером 0 равна C_0 , при этом во всех других теоретических тарелках его концентрация равна 0.

$$\begin{cases} C_{m(p)} = C_0, & p = 0, \\ C_{m(p)} = 0, & p > 0. \end{cases}$$

Для $p = 0$:

$$\frac{dC_{m(0)}}{dv} = -C_{m(0)}; \quad (28)$$

$$\ln(C_{m(0)}) = -v + a_0. \quad (29)$$

При $v = 0$ (то есть в начальный момент времени, когда объем прокачанной через колонку подвижной фазы $V = 0$) $C_{m(0)} = C_0$. Тогда $a_0 = \ln(C_0)$ и

$$C_{m(0)} = C_0 \cdot e^{-v}. \quad (30)$$

Для $p = 1$:

$$\frac{dC_{m(1)}}{dv} = C_{m(0)} - C_{m(1)} = C_0 \cdot e^{-v} - C_{m(1)}; \quad (31)$$

$$\frac{dC_{m(1)}}{dv} \cdot e^v + C_{m(1)} \cdot e^v = C_0; \quad (32)$$

$$\frac{d(C_{m(1)} \cdot e^v)}{dv} = C_0; \quad (33)$$

$$C_{m(1)} \cdot e^v = C_0 \cdot v + a_1. \quad (34)$$

При $v = 0$ (то есть в начальный момент времени, когда объем прокачанной через колонку подвижной фазы $V = 0$) $C_{m(1)} = 0$. Тогда $a_1 = 0$ и

$$C_{m(1)} = C_0 \cdot v \cdot e^{-v}. \quad (35)$$

Аналогично для $p = 2$:

$$C_{m(2)} = C_0 \cdot \frac{v^2}{1 \cdot 2} \cdot e^{-v}. \quad (36)$$

Аналогично для $p = 3$:

$$C_{m(3)} = C_0 \cdot \frac{v^3}{1 \cdot 2 \cdot 3} \cdot e^{-v}. \quad (37)$$

Для $p = N$ (то есть для последней теоретической тарелки, которая находится на выходе из колонки) получаем

$$C_{m(N)} = C_0 \cdot \frac{v^N}{N!} \cdot e^{-v}. \quad (38)$$

Таким образом, зависимость концентрации исследуемого вещества на выходе из колонки от v имеет вид распределения Пуассона. Покажем, что при $N \gg 1$ распределение Пуассона переходит в рас-

пределение Гаусса (для современных хроматографических колонок число теоретических тарелок $N \sim 10\,000$).

График функции $C_{m(N)}(v)$ показан на рис. 6. Данная функция имеет максимум при $v = N$.

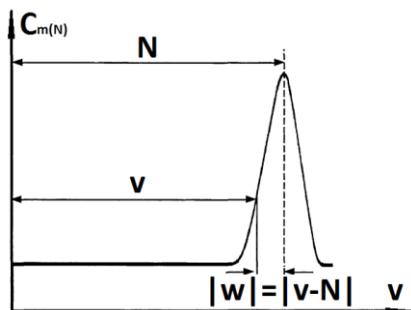


Рис. 6. Зависимость концентрации исследуемого вещества на выходе из колонки от v [9]

Введем новую переменную $w = v - N$, тогда

$$C_{m(N)} = C_0 \cdot \frac{(w + N)^N}{N!} \cdot e^{-(w+N)}. \quad (39)$$

Применяя формулу Стирлинга $N! \approx e^{-N} \cdot N^N \cdot \sqrt{2\pi N}$, получаем

$$C_{m(N)} \approx C_0 \cdot \frac{(w + N)^N}{e^{-N} \cdot N^N \cdot \sqrt{2\pi N}} \cdot e^{-(w+N)} = \frac{C_0}{\sqrt{2\pi N}} \cdot e^{-w} \cdot \left(1 + \frac{w}{N}\right)^N. \quad (40)$$

Прологарифмируем формулу (33):

$$\ln(C_{m(N)}) = \ln\left(\frac{C_0}{\sqrt{2\pi N}}\right) - w + N \cdot \ln\left(1 + \frac{w}{N}\right). \quad (41)$$

В некоторой окрестности $v = N$, в которой выполняется условие $\frac{|w|}{N} \ll 1$, логарифм можно приближенно аппроксимировать первыми двумя членами ряда Тейлора:

$$\begin{aligned} \ln(C_{m(N)}) &\approx \ln\left(\frac{C_0}{\sqrt{2\pi N}}\right) - w + N \cdot \left(\frac{w}{N} - \frac{w^2}{2 \cdot N^2}\right) = \\ &= \ln\left(\frac{C_0}{\sqrt{2\pi N}}\right) - \frac{w^2}{2 \cdot N}; \end{aligned} \quad (42)$$

$$C_{m(N)} = \frac{C_0}{\sqrt{2\pi N}} \cdot e^{-\frac{w^2}{2 \cdot N}} = \frac{C_0}{\sqrt{2\pi N}} \cdot e^{-\frac{(v-N)^2}{2 \cdot N}}. \quad (43)$$

Стандартный вид распределения Гаусса записывается следующим образом:

$$f(x) = \frac{1}{\sigma \cdot \sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2 \cdot \sigma^2}}, \quad (44)$$

где μ – среднее значение x (абсцисса максимума функции $f(x)$),

σ – среднеквадратичное отклонение (половина ширины пика, на высоте в \sqrt{e} раз меньше, чем максимальная высота).

Таким образом, зависимость концентрации исследуемого вещества на выходе из колонки от v имеет вид гауссовой кривой, при этом

$$\sigma = \sqrt{N}. \quad (45)$$

Воспользуемся правилом 3σ и будем считать, что практически весь пик находится в интервале $N \pm 3\sigma$. Тогда

$$\frac{|w|}{N} < \frac{3\sigma}{N} = \frac{3}{\sqrt{N}} \approx \frac{3}{\sqrt{10\,000}} = 0.03 \ll 1. \quad (46)$$

Следовательно, условие $\frac{|w|}{N} \ll 1$ выполняется для всего пика при больших значениях N , характерных для современных хроматографических колонок.

Сделаем замену переменных:

$$v = \frac{V}{V_m + K \cdot S} = \frac{F}{V_m + K \cdot S} \cdot t = q \cdot t; \quad q = \frac{F}{V_m + K \cdot S}. \quad (47)$$

Тогда

$$C_{m(N)} = \frac{C_0}{\sqrt{2\pi N}} \cdot e^{-\frac{(q \cdot t - N)^2}{2 \cdot N}} = \frac{C_0}{q} \cdot \frac{1}{\sqrt{N} \cdot \sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{(t - \frac{N}{q})^2}{2 \cdot (\frac{N}{q^2})}}. \quad (48)$$

То есть зависимость концентрации исследуемого вещества на выходе из колонки от времени также имеет вид гауссовой кривой, при этом

$$\sigma = \frac{\sqrt{N}}{q}; \quad (49)$$

$$t_{max} \equiv \mu = \frac{N}{q}, \quad (50)$$

где t_{max} – время появления максимума концентрации исследуемого вещества на выходе из колонки.

Из формул (49) и (50) получаем

$$N = \left(\frac{t_{max}}{\sigma}\right)^2. \quad (51)$$

Из формул (47) и (50) получаем

$$t_{max} = \frac{N}{q} = \frac{N \cdot (V_m + K \cdot S)}{F} = \frac{V_0 \cdot \left(1 + K \cdot \frac{S}{V_m}\right)}{F} = t_0 \cdot (1 + k), \quad (52)$$

$$k = K \cdot \frac{S}{V_m} = K \cdot S_V \cdot \frac{V_S}{V_M} = K \cdot S_V \cdot \varphi, \quad (53)$$

$V_0 = N \cdot V_m$ – мертвый объем колонки (объем, занятый подвижной фазой),

$t_0 = \frac{V_0}{F}$ – мертвое время (время выхода несорбируемых веществ),

k – фактор удерживания (см. ниже раздел 2.4. Хроматограмма и хроматографические параметры),

V_S – объем неподвижной фазы в каждой теоретической тарелке,

$S_V = \frac{S}{V_S}$ – удельная поверхность неподвижной фазы,

$\varphi = \frac{V_S}{V_M}$ – фазовое отношение.

Из теории теоретических тарелок можно сделать следующие выводы:

- Если количество теоретических тарелок в колонке $N \gg 1$ и равновесие описывается линейной изотермой Генри, то хроматографический пик исследуемого вещества имеет форму гауссовой кривой. Стоит отметить, что форма хроматографического пика существенно зависит от типа изотермы равновесия. На рис. 7 качественно показана эта зависимость.
- Ширина хроматографического пика определяется числом теоретических тарелок. Зная ширину пика и положение его максимума, можно вычислить число теоретических тарелок по формуле (51).
- Время выхода исследуемого вещества из колонки линейно растет с ростом константы равновесия, удельной поверхности сорбента и фазового отношения.

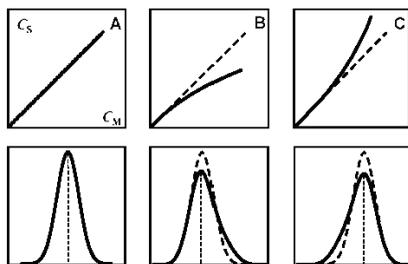


Рис. 7. Изменение формы пика в зависимости от вида изотермы распределения.

А – изотерма Генри, В – изотерма Ленгмюра, С – изотерма полисубstituted адсорбции

2.4. Хроматограмма и хроматографические параметры

На рис. 8 приведен пример хроматограммы и обозначены основные параметры, которые могут быть получены при ее анализе. Стоит отметить, что изменение концентрации вещества в подвижной фазе определяется детектором по изменению какой-либо физической величины, функционально связанной с концентрацией (электропроводность, оптическая плотность, интенсивность флуоресценции и т.д.), и поэтому на практике хроматограмма представляет собой зависимость величины отклика детектора от времени.

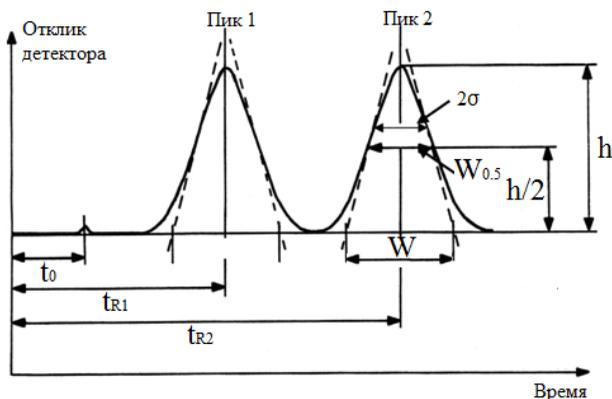


Рис. 8. Схематическое представление хроматограммы

Время, регистрируемое от момента ввода пробы в систему до момента появления максимума пика на хроматограмме, называется *абсолютным временем удерживания* t_R . То есть $t_R \equiv t_{max}$, и количество теоретических тарелок может быть вычислено по следующей формуле:

$$N = \left(\frac{t_{max}}{\sigma}\right)^2 = \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2. \quad (54)$$

На практике вместо измерения среднеквадратичного отклонения пика обычно измеряют ширину пика либо у базовой линии W , либо на половине высоты $W_{0.5}$. Ширина пика у базовой линии — это отрезок основания пика, отсекаемый двумя касательными, проведенными в точках перегиба восходящей и нисходящей ветвей пика.

Используя эти данные, *число теоретических тарелок* можно вычислить по следующим формулам:

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{W_{0.5}}\right)^2 = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{W_S}\right)^2. \quad (55)$$

Число теоретических тарелок является показателем эффективности колонки. ВЭТТ отражает качество используемого сорбента, качество заполнения колонки и правильность выбора режима хроматографирования.

При постоянных условиях работы и неизменном составе подвижной/неподвижной фаз хроматографической системы (*изократический режим*) время удерживания является величиной постоянной для данного вещества.

Иногда в начальной части хроматограммы регистрируется пик, природа которого связана с кратковременным нарушением равновесия в колонке при вводе пробы. Этому пику соответствует время удерживания несорбируемого вещества t_0 , мертвое время. На практике мертвое время часто определяется при введении в колонку несорбируемого вещества. При расчетах основных хроматографических параметров используют *приведенное время удерживания*:

$$t'_R = t_R - t_0. \quad (56)$$

Время удерживания также зависит от скорости подачи через колонку подвижной фазы F (объемная скорость потока). *Удерживаемый объем* данного вещества рассчитывается как

$$V_R = t_R \cdot F. \quad (57)$$

Приведенный объем удерживания – это объем удерживания с поправкой на мертвый объем колонки V_0 , т.е. на объем удерживания несорбируемого компонента:

$$V'_R = V_R - V_0. \quad (58)$$

Одним из основополагающих параметров в жидкостной хроматографии является *фактор удерживания (коэффициент емкости) k* , равный отношению приведенного объема удерживания к мертвому объему колонки или отношению приведенного времени удержания к мертвому времени:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{V_R - V_0}{V_0}. \quad (59)$$

Фазовое отношение φ – еще одна важная характеристика системы, позволяющая связать хроматографический процесс со статическим процессом распределения и далее – с термодинамическими параметрами сорбции. Фазовое отношение находится как отношение *объема неподвижной фазы в колонке* – V_s к *свободному объему колонки* – V_m :

$$\varphi = \frac{V_s}{V_m}. \quad (60)$$

Коэффициент емкости связан с *коэффициентом распределения* в данной системе K и свободной энергией сорбции ΔG отношением

$$k = K \cdot \varphi = \varphi \cdot e^{-\frac{\Delta G}{RT}}. \quad (61)$$

Сравнительную термодинамическую характеристику двух разделяемых пиков веществ дает *относительное удерживание или селективность*:

$$\alpha_{i,j} = \frac{t_{R1} - t_0}{t_{R2} - t_0}. \quad (62)$$

Эта величина показывает способность данной хроматографической системы разделять данную пару веществ 1 и 2.

Времена удерживания и все производные от них величины являются термодинамическими характеристиками процесса. Однако в хроматографии (как и в любом химическом процессе) на результат влияют как факторы термодинамического типа, так и кинетического. Если в хроматографической системе данного состава при данной температуре у двух веществ значения t_R одинаковы (или $\alpha = 1,0$), то никакое изменение геометрии колонки не приведет к разделению этой пары. Но, с другой стороны, различие значений t_R вовсе не означает, что разделение будет достигнуто. Для этого используемая колонка должна обладать достаточно высокими кинетическими характеристиками. Акты сорбции-десорбции должны совершаться с большой скоростью, чтобы реализовать потенциальную возможность разделения, на которую указывает различие в t_R .

В качестве количественной характеристики степени разделения используется критерий разрешения R_S :

$$R_S = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_2 + W_1}. \quad (63)$$

Основные хроматографические параметры разрешения связаны следующим уравнением:

$$R_S = \frac{1}{4} \left[\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right] \left[\frac{k}{1 + k} \right] \sqrt{N}. \quad (64)$$

Разрешающая способность, таким образом, определяется произведением трех сомножителей, первый из которых выражает зависимость от селективности колонки, второй – от коэффициента емкости колонки и третий – от эффективности колонки (числа теоретических тарелок).

Рассмотрим это *основное уравнение ВЭЖХ* (64) более подробно. Если $\alpha = 1$, то разрешающая способность равна 0, т.е. разделение отсутствует независимо от числа теоретических тарелок в колонке. Однако небольшие изменения могут привести к заметному увеличению разрешающей способности, особенно для тех случаев, когда значения α близки к 1. Таким образом, на фактор селективности следует обращать основное внимание при подборе условий разделения, учитывая

различие во взаимодействии разделяемых компонентов как в неподвижной, так и в подвижной фазе.

В отличие от газовой хроматографии, в которой взаимодействия в подвижной (газовой) фазе незначительны и селективность системы в основном определяется только взаимодействиями веществ с неподвижной фазой, в жидкостной хроматографии подвижная (жидкая) фаза не является инертной, а может играть главную роль в процессе термодинамического распределения разделяемых компонентов смеси между неподвижной и подвижной фазами вследствие селективного взаимодействия разделяемых веществ с подвижной фазой.

Второй сомножитель в уравнении принимает значение, равное 0 (при этом разрешающая способность также равна 0, т.е. разделение отсутствует), в том случае, когда коэффициент емкости для второго компонента равен 0, т.е. оба разделяемых компонента элюируются как несорбируемые вещества (взаимодействие с неподвижной фазой отсутствует). С ростом значения k' разрешающая способность увеличивается, при этом возрастает и длительность анализа.

Наконец, из третьего сомножителя видно, что разрешающая способность пропорционально квадратному корню из числа теоретических тарелок, т.е. для увеличения разрешающей способности вдвое нужно увеличить эффективность колонки в 4 раза (например, использовать колонку в 4 раза длиннее). Удлинение колонки в 4 раза приводит к увеличению продолжительности анализа также вчетверо, т.е. скорость анализа падает. Как правило, если эффективность колонки недостаточна, а скорость анализа является важным фактором, для повышения эффективности используют колонку с более мелким по зернению сорбентом. Однако в этом случае платой за большую эффективность при той же скорости анализа является повышение давления на колонке в соответствии с формулой

$$p = \frac{U\psi\eta L}{d^2}, \quad (65)$$

где U – линейная скорость потока, ψ – фактор сопротивления колонки, η – вязкость элюента, L – длина колонки, d – диаметр частиц сорбента.

Несмотря на то, что эффективность колонки оказывает меньшее влияние на разрешение, чем селективность и коэффициент емкости, как производители, так и потребители придают большое значение повышению эффективности колонок. Одной из причин этого является отсутствие возможности подбора таких условий разделения, чтобы селективность была высокой для всех компонентов сложных смесей неизвестного состава. В этом случае высокая эффективность колонки позволяет добиться разделения двух веществ с небольшим значением α .

2.5. Уравнение Ван-Деемтера

При помощи теории теоретических тарелок можно экспериментально определить эффективность колонки N , от которой зависят такие важные параметры, как разрешение и ширина пика. Однако теория теоретических тарелок не предсказывает факторы, влияющие на эффективность. В 1950-х годах Ван-Деемтером было получено уравнение, связывающее различные параметры разделения с высотой эквивалентной теоретической тарелки. Для выведения этого уравнения им были проанализированы различные процессы, приводящие к уширению хроматографического пика.

ВЭТТ связана с σ хроматографического пика следующим соотношением:

$$H = \frac{L}{N} = \frac{L}{\left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2} = L \cdot \frac{\sigma^2}{t_R^2}. \quad (66)$$

Пусть несколько различных процессов вносят вклад в уширение, тогда

$$\sigma^2 = \sigma_1^2 + \sigma_1^2 + \sigma_1^2 + \dots; \quad (67)$$

$$H = H_1 + H_2 + H_3 + \dots. \quad (68)$$

Также стоит отметить, что, делая замену переменных $V = F \cdot t$ и $x = u \cdot t$, где x – дистанция, пройденная вдоль колонки, а $u = \frac{L}{t_R}$ – средняя скорость движения исследуемого вещества по колонке, можно представить хроматограмму как зависимость $C_m(V)$ или $C_m(x)$ (рис. 9).

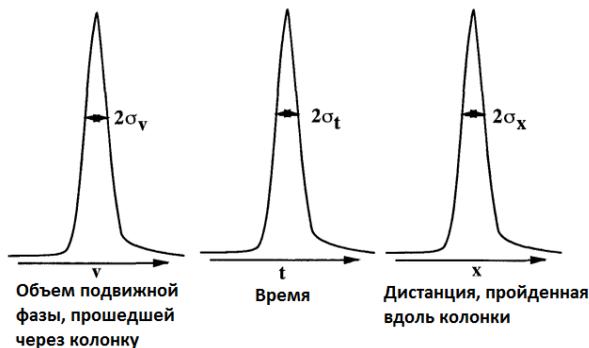


Рис. 9. Различные представления хроматограммы [9]

При этом

$$\frac{\sigma_t^2}{t_R^2} = \frac{\sigma_V^2}{V_R^2} = \frac{\sigma_x^2}{L^2}. \quad (69)$$

Так как $\frac{\sigma_t^2}{t_R^2} = \frac{1}{N}$, то

$$\frac{\sigma_x^2}{L^2} = \frac{1}{N}; \quad \frac{\sigma_x^2}{L} = \frac{L}{N} = H. \quad (70)$$

Рассмотрим теперь различные процессы, приводящие к уширению хроматографического пика.

2.5.1. Продольная диффузия

Одной из причин уширения хроматографического пика является продольная диффузия молекул исследуемого вещества. Стоит отметить, что диффузия происходит как в подвижной, так и в неподвижной фазе, однако в неподвижной фазе диффузия обычно происходит значительно медленнее и ее вкладом в уширение можно пренебречь. Продольная диффузия описывается одномерным уравнением диффузии:

$$\frac{dC}{dt} = D_m \cdot \frac{d^2C}{dx^2}, \quad (71)$$

где D_m – коэффициент диффузии исследуемого вещества в подвижной фазе.

Решение данного уравнения имеет вид распределения Гаусса и записывается следующим образом:

$$C = \frac{C_0}{\sqrt{t}} \cdot e^{-\frac{x^2}{4D_m t}}. \quad (72)$$

При этом

$$\sigma_x^2 = 2D_m t. \quad (73)$$

При движении хроматографического пика по колонке в течение времени выхода t_R молекулы исследуемого вещества в среднем находятся в подвижной фазе время

$$t = \frac{t_0}{t_R} \cdot t_R = t_0 = \frac{L}{u_0}. \quad (74)$$

Таким образом,

$$\sigma_x^2 = 2D_m t_0 = 2D_m \frac{L}{u_0}; \quad (75)$$

$$H = \frac{\sigma_x^2}{L} = \frac{2D_m}{u_0}. \quad (76)$$

Выведенное уравнение хорошо подходит для капиллярных колонок, не набитых частицами сорбента. В набитых сорбентом колонках подвижная фаза движется, обтекая частицы сорбента, что приводит к изменению эффективного коэффициента диффузии. Для учета влияния этого фактора Ван-Деемтером была введена константа γ :

$$H = \frac{2\gamma D_m}{u_0}. \quad (77)$$

По оценкам, для хорошо набитой колонки $\gamma \approx 0.6$.

2.5.2. Различие траекторий движения молекул по колонке

При движении по колонке, набитой частицами сорбента, молекулы исследуемого вещества могут двигаться по различным траекториям, вследствие чего возникает уширение хроматографического пика (рис. 10а). Рассмотрим сначала задачу о «случайных блужданиях», решение которой потребуется нам для оценки уширения пика из-за различия траекторий движения.

Пусть точка движется вдоль оси x из положения $x = 0$. Считаем, что за один шаг точка может либо сместиться вперед на расстояние s с вероятностью p , либо остаться на месте. Тогда вероятность сместиться на расстояние $m \cdot s$ за n шагов описывается биномиальным распределением:

$$P_n(m) = C_n^m (p)^m (1-p)^{n-m}. \quad (78)$$

В курсе теории вероятностей показано, что при больших n и фиксированной вероятности p биномиальное распределение переходит в нормальное. При этом среднеквадратичное отклонение положения точки определяется формулой

$$\sigma_x = s \cdot \sqrt{n}. \quad (79)$$

Рассмотрим простую модель, при которой молекула при встрече с частицей сорбента равновероятно может либо продвинуться вдоль колонки на величину, равную диаметру частицы d_p , либо отклониться перпендикулярно потоку, при этом ее положение вдоль колонки не изменится (рис. 10б).

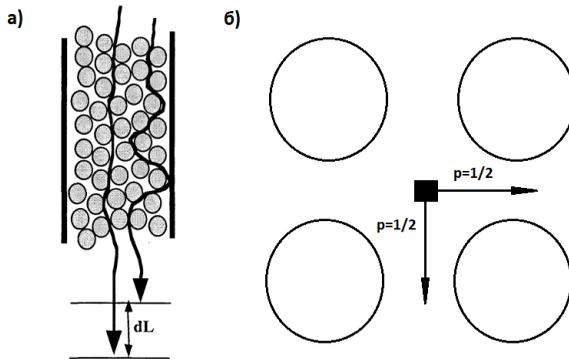


Рис. 10. Различие траекторий движения молекул по колонке [9]

Количество частиц сорбента, которые встречает каждая молекула, можно оценить по формуле

$$n = \frac{L}{d_p}. \quad (80)$$

Тогда для вклада в ВЭТТ различий траекторий движения молекул по колонке получаем

$$H = \frac{\sigma_x^2}{L} = \frac{d_p^2 \cdot n}{L} = \frac{d_p^2 \cdot L}{L \cdot d_p} = d_p. \quad (81)$$

Полученное уравнение справедливо только для идеально набитых колонок. Для учета негомогенности набивки Ван-Деемтером была введена константа 2λ (для идеально набитых колонок $\lambda = 0.5$):

$$H = 2\lambda d_p. \quad (82)$$

2.5.3. Сопротивление массопереносу

Для захвата молекул исследуемого вещества неподвижной фазой они сначала должны достичь ее поверхности; движение к поверхности неподвижной фазы происходит за счет диффузии. Так как при движении по колонке молекулы сорбата находятся в разных положениях по отношению к поверхности сорбента (часть из них находится ближе, другая часть дальше), они не одновременно взаимодействуют с сорбентом, и возникает дополнительное размытие пика.

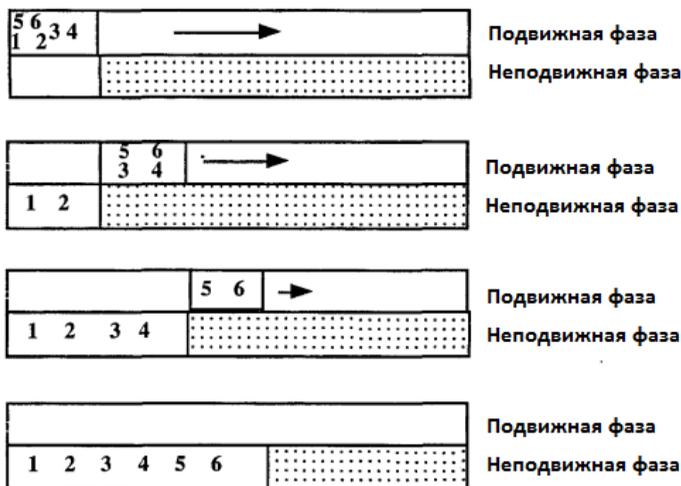


Рис. 11. Сопротивление массопереносу в подвижной фазе [9]

Рассмотрим схематично механизм такого уширения (рис. 11). Пусть 6 молекул сорбата первоначально находились рядом друг с другом. Молекулы 1 и 2 находились ближе к поверхности сорбента и раньше других успели адсорбироваться. Пока молекулы 3 и 4 двигались к поверхности сорбента и адсорбировались на ней, они сместились из-за движения подвижной фазы. Молекулы 5 и 6 находились дальше всего от поверхности сорбента и сместились сильнее.

Аналогично из-за разницы глубины диффузии внутрь сорбента происходит сопротивление массопереносу в неподвижной фазе (рис. 12).

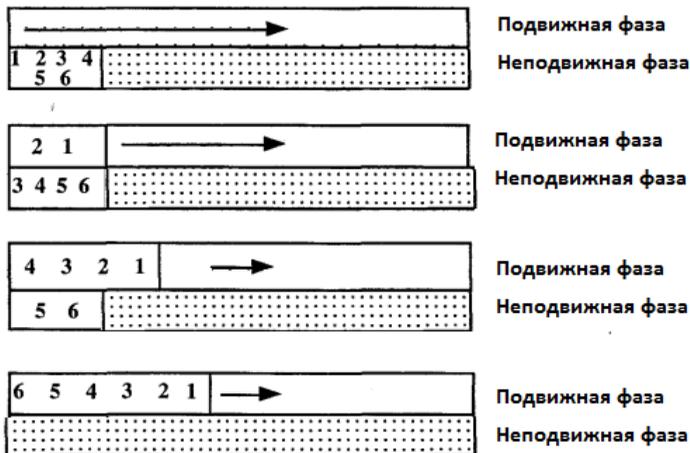


Рис. 12. Сопротивление массопереносу в неподвижной фазе [9]

Пусть 6 молекул сорбата первоначально находились рядом друг с другом в адсорбированном состоянии. Молекулы 1 и 2 находились ближе к поверхности сорбента и раньше других десорбировались. За время, пока молекулы 3 и 4 двигались к поверхности сорбента, молекулы 1 и 2 успели сместиться из-за движения подвижной фазы. За время, пока молекулы 5 и 6 двигались к поверхности сорбента, молекулы 1 и 2 сместились еще дальше.

Так как диффузия в подвижной фазе обычно происходит значительно быстрее, чем в неподвижной, то влиянием сопротивления массопереносу в подвижной фазе на ВЭТТ часто можно пренебречь, так как оно существенно меньше, чем влияние массопереноса в неподвижной фазе.

Для количественной оценки сопротивления массопереносу будем использовать описанную выше задачу о случайных блужданиях. Пусть молекула сорбата в среднем проводит время t_a в свободном состоянии между двумя последовательными актами адсорбции. Пусть также среднее время нахождения в адсорбированном состоянии равно t_d :

$$\frac{t_a}{t_d} = \frac{t_0}{t_{R'}} = \frac{1}{k}. \quad (83)$$

За время t_a молекула сорбата успевает сместиться на расстояние $u_0 \cdot t_a$. При этом ее смещение относительно максимума хроматографического пика можно вычислить по формуле

$$\begin{aligned} s &= (u_0 - u) \cdot t_a = \left(u_0 - \frac{u_0}{1+k}\right) \cdot t_a = \frac{k}{k+1} \cdot u_0 \cdot t_a = \\ &= \frac{1}{k+1} \cdot u_0 \cdot t_a. \end{aligned} \quad (84)$$

Число актов сорбции равно числу актов десорбции и равно $\frac{L}{u_0 t_a}$.

Рассмотрим сначала сопротивление массопереносу в неподвижной фазе. Пусть молекулы десорбируются с поверхности сорбента с некоторой постоянной вероятностью. Тогда количество шагов для модели случайных блужданий будет пропорционально количеству актов десорбции, то есть

$$n = \frac{L}{u_0 \cdot t_a} \cdot q'. \quad (85)$$

Следовательно, для среднеквадратичного отклонения молекул сорбата из-за сопротивления массопереносу в неподвижной фазе получаем:

$$\sigma_x = s \cdot \sqrt{n} = \frac{k}{k+1} \cdot u_0 \cdot t_a \cdot \sqrt{\frac{L}{u_0 t_a} \cdot q'}; \quad (86)$$

$$\sigma_x^2 = \left(\frac{k}{k+1}\right)^2 \cdot u_0 \cdot t_a \cdot L \cdot q'; \quad (87)$$

$$H = \frac{\sigma_x^2}{L} = \left(\frac{k}{k+1}\right)^2 \cdot u_0 \cdot t_a \cdot q' = q' \cdot \frac{k}{(k+1)^2} \cdot u_0 \cdot t_a. \quad (88)$$

Среднее время нахождения в адсорбированном состоянии может быть найдено из уравнения диффузии в неподвижной фазе:

$$d_f^2 = 2D_s t_d, \quad (89)$$

D_s – коэффициент диффузии исследуемого вещества в неподвижной фазе,

d_f – средняя глубина диффузии в неподвижную фазу.

Окончательно для вклада в ВЭТТ *сопротивления массопереносу в неподвижной фазе* получаем

$$H = \frac{q'}{2} \cdot \frac{k}{(k+1)^2} \cdot u_0 \cdot \frac{d_f^2}{D_s} = q \cdot \frac{k}{(k+1)^2} \cdot \frac{d_f^2}{D_s} \cdot u_0; q = \frac{q'}{2}. \quad (90)$$

Для сферических частиц сорбента $q = \frac{2}{15}$.

Рассмотрим теперь сопротивление массопереносу в подвижной фазе. Считаем, что молекулы исследуемого вещества сорбируются с некоторой постоянной вероятностью. Тогда количество шагов для модели случайных блужданий будет пропорционально количеству актов сорбции, то есть

$$n = \frac{L}{u_0 \cdot t_a} \cdot q'' \quad (91)$$

Следовательно, для среднеквадратичного отклонения молекул сорбата из-за сопротивления массопереносу в подвижной фазе получаем:

$$\sigma_x = s \cdot \sqrt{n} = \frac{k}{k+1} \cdot u_0 \cdot t_m \cdot \sqrt{\frac{L}{u_0 \cdot t_a} \cdot q''}, \quad (92)$$

$$\sigma_x^2 = \left(\frac{k}{k+1}\right)^2 \cdot u_0 \cdot t_m \cdot L \cdot q'', \quad (93)$$

где t_m – среднее время диффузии молекул в подвижной фазе до поверхности сорбента.

Среднее расстояние l_m , которое требуется пройти молекуле в подвижной фазе до поверхности сорбента, зависит от размера частиц сорбента (чем меньше диаметр частиц сорбента, тем меньше будут промежутки между ними). Введем константу q''' , пусть $l_m = q''' \cdot d_p$. Тогда, решая уравнение диффузии для движения молекул в подвижной фазе, получаем

$$(q''')^2 \cdot d_p^2 = 2D_m t_m, \quad (94)$$

D_m – коэффициент диффузии исследуемого вещества в подвижной фазе,

d_p – средний размер частиц сорбента.

Окончательно для вклада в ВЭТТ *сопротивления массопереносу в подвижной фазе* получаем:

$$H = (q'' \cdot (q''')^2) \cdot \frac{k^2}{(k+1)^2} \cdot u_0 \cdot \frac{d_p^2}{D_m} = \omega \cdot \frac{d_p^2}{D_m} \cdot u_0, \quad (95)$$

$$\omega = (q'' \cdot (q''')^2) \cdot \frac{k^2}{(k+1)^2}. \quad (96)$$

Учитывая влияние всех описанных выше процессов окончательно для ВЭТТ получаем следующее выражение:

$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_m}{u_0} + \frac{2}{15} \cdot \frac{k}{(k+1)^2} \cdot \frac{d_f^2}{D_s} \cdot u_0 + \omega \cdot \frac{d_p^2}{D_m} \cdot u_0. \quad (97)$$

Полученное уравнение, связывающее ВЭТТ с различными физическими величинами, получило название *уравнение Ван-Деемтера*. Вводя новые константы A , B и C , можно более кратко записать полученное уравнение:

$$H = A + \frac{B}{u_0} + C \cdot u_0. \quad (98)$$

Зависимость ВЭТТ от скорости движения подвижной фазы представлена на рис. 13. Эта зависимость имеет минимум, то есть существует *оптимальная скорость движения подвижной фазы*, при которой эффективность колонки будет максимальна.

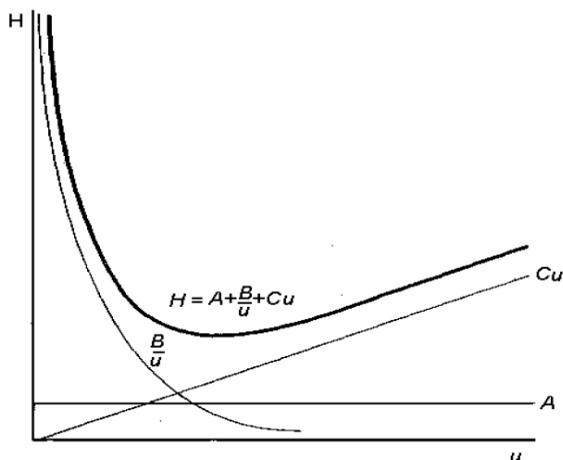


Рис. 13. Уравнение Ван-Деемтера

2.6. Виды сорбентов

Становление ВЭЖХ в значительной мере связано с созданием новых поколений сорбентов с хорошими кинетическими свойствами и разнообразными термодинамическими свойствами. Основным материалом для сорбентов – силикагель (рис. 14). Он механически прочен, что позволяет упаковывать его в колонки и использовать при повышенных давлениях, характерных для ВЭЖХ. Силикагель обладает значительной пористостью, что дает большую обменную емкость при небольших размерах колонки (удельная поверхность 10–600 м²/г). Обычно используют колонки диаметром 4 мм и длиной 100–250 мм, заполненные силикагелем фракцией 5–10 мкм. Такие колонки при расходе подвижной фазы 1.0–2.0 см³/мин работают при давлении 50–300 атм. Чем ближе к шарообразной форма частиц, тем меньше сопротивление

потоку, выше эффективность, особенно, если отсеяна очень узкая фракция.

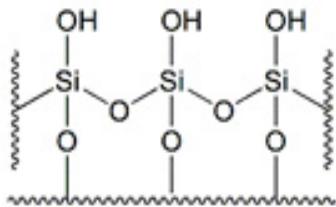


Рис. 14. Структура силикагеля

Силикагель может быть модифицирован различными химическими группами, привитыми к поверхности (C8, C18, CN, NH₂, SO₃H), что позволяет использовать сорбенты на его основе для разделения самых различных классов соединений.

Основной недостаток силикагеля – малая химическая стойкость при pH < 2 и pH > 9 (в щелочах и кислотах силикагель растворяется). Поэтому в настоящее время идет интенсивный поиск сорбентов на базе полимеров, стойких при pH от 1 до 14, например, на основе полиметилметакрилата, полистирола и т.д.

2.6.1. Нормально-фазовая хроматография

Разделение методом нормально-фазовой хроматографии осуществляется в результате взаимодействия вещества с адсорбентами, такими как силикагель или оксид алюминия, имеющими на поверхности активные центры (рис. 15). Различие в способности к взаимодействию с адсорбционными центрами различных молекул пробы приводит к их разделению на зоны в процессе движения по колонке. Достижимое при этом разделение зон компонентов зависит от взаимодействия как с растворителем, так и с адсорбентом.

В основе сорбции на поверхности адсорбента, имеющего гидроксильные группы, лежит специфическое взаимодействие между полярной поверхностью адсорбента и полярными (или способными поляризоваться) группами или участками молекул. К таким взаимодействиям относят диполь-дипольное взаимодействие между постоянными или индуцированными диполями, образование водородной связи вплоть до образования π -комплексов или комплексов с переносом заряда. Возможным и достаточно частым в практической работе является проявление хемосорбции, которая может привести к значительному

повышению времени удерживания, резкому снижению эффективности, появлению продуктов разложения или необратимой сорбции вещества.

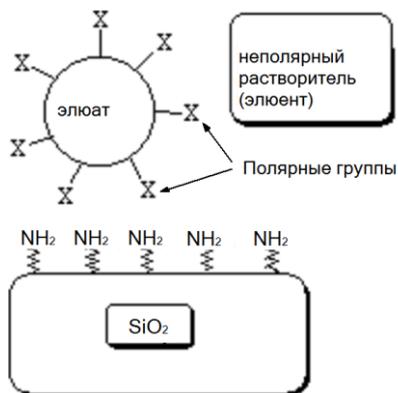


Рис. 15. Распределительная хроматография с привитой фазой (нормально-фазовый вариант)

В качестве подвижной фазы в нормально-фазовой хроматографии используют неполярные растворители, такие как н-гексан, н-гептан, изооктан с небольшой добавкой метанола, этанола или изопропилового спирта (1–10%). Практическое использование нормально-фазовой хроматографии крайне затруднено из-за микроколичеств влаги, содержащейся в растворителях, которая закрывает адсорбционные центры силикагеля. При этом постоянно изменяются («плывут») времена удерживания разделяемых компонентов. Детектор, обычно используемый для данного метода (УФ-спектрофотометр), длительное время выходит на рабочий режим из-за дрейфа нулевой линии. Есть много методов борьбы с этими явлениями, но гораздо проще использовать метод обращенно-фазовой хроматографии и при этом достигать аналогичных результатов разделения компонентов.

Метод нормально-фазовой хроматографии оправдан, когда необходимо получить разделение изомеров положения, например м-, о-, п-крезолов, ксилолов и т.д.

2.6.2. Обращенно-фазовая хроматография

Вариант жидкостной хроматографии, в котором используют сорбент с привитыми неполярными (как правило, длинными алкильными, C8 и C18, или алкилсилильными) группами и полярный растворитель (водно-метанольные, водно-ацетонитрильные смеси).

Существует принципиальное различие между процессами сорбции на полярных поверхностях из относительно неполярных растворителей (нормально-фазовый режим) и сорбции из воды либо сильнополярных растворителей на поверхностях неполярных. Причиной ассоциации на неполярных поверхностях являются так называемые сольвофобные взаимодействия в подвижной фазе. Для полярных подвижных фаз, в особенности содержащих воду, характерно сильное кулоновское взаимодействие и образование водородных связей между молекулами растворителей. Все молекулы в таких растворителях связаны довольно прочными межмолекулярными силами. Для того чтобы поместить в эту среду молекулу сорбата, необходимо образование «полости» между молекулами растворителя. Энергетические затраты на образование такой «полости» лишь частично покрываются за счет взаимодействия полярных групп в молекуле сорбата с полярными молекулами растворителя. В аналогичном положении по отношению к растворителю находятся и неполярные молекулы неподвижной фазы. С энергетической точки зрения более выгодно такое положение, когда поверхность раздела между полярной средой (растворителем) и неполярными фрагментами неподвижной фазы и молекул сорбата минимальна. Уменьшение этой поверхности и достигается при сорбции (рис. 16).

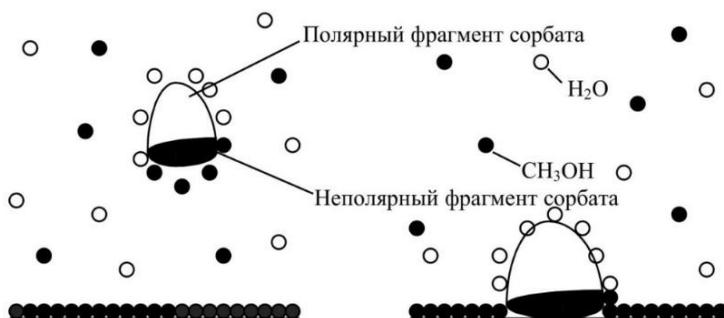


Рис. 16. Механизм сорбции при обращенно-фазовой хроматографии

Таким образом, причиной сорбции в обращенно-фазовой хроматографии служит сильное притяжение полярных молекул растворителя одна к другой, как бы «прижимающее» растворенные менее полярные молекулы к неполярной поверхности.

Метод обращенно-фазовой ВЭЖХ получил широкое распространение благодаря нескольким факторам. Во-первых, были разработаны и быстро внедрены в производство сорбенты, имеющие привитые ал-

кильные группы различной длины (от C₂ до C₂₂ с прямой алкильной цепью, фенильной и дифенильной группами). Во-вторых, используемые растворители – ацетонитрил, метанол, вода – прозрачны для ультрафиолета, поэтому позволяют работать в широком УФ-диапазоне. В-третьих, растворители, используемые в обращенно-фазовых разделениях, относительно легко растворяют практически все важнейшие группы веществ. В частности, соединения, находящиеся в организме человека и других биологических объектах, молекулы, используемые в виде лекарственных препаратов, пестицидов, гербицидов, вещества, широко применяемые в органической химии, нефтехимии и биологической химии. В-четвертых, сорбенты в обращенно-фазовой ВЭЖХ быстро приходят в равновесие с новыми растворителями и при изменении состава растворителя, что позволяет переходить от одной методики к другой с использованием одной и той же колонки, а также широко применять градиентное элюирование с быстрым восстановлением равновесия сорбента с исходным растворителем. Немаловажно, что загрязненный сорбент в колонке может быть промыт и приведен снова в рабочее состояние при прокачивании через колонку растворителей, удаляющих загрязнения.

Наиболее популярный сорбент в обращенно-фазовой хроматографии – силикагель с привитыми алкильными цепочками. Широко распространены такие марки, как Силасорб-С18, Сепарон-С18, Партицил-ОДС (ОДС – означает октадецилсилан). Нужно принимать во внимание, что характеристики удерживания и селективности для обращенно-фазовых сорбентов меняются не только при переходе от сорбента одного производителя к сорбенту другого, но и при переходе от одной партии сорбента к другой партии того же производителя. При создании методики анализа методом жидкостной хроматографии невозможно задать жесткие условия состава элюента из-за вариации свойств сорбентов, как правило, небольшое изменение процентного состава (до 10%) элюента необходимо для оптимизации разделения.

Кроме силикагелей С18 в хроматографии используют силикагели с привитыми циано- (CN) и amino- (NH₂) группами. Эти фазы нашли широкое применение в биологии, медицине, биохимии, фармакологии и др.

2.7. Градиентный и изократический режимы разделения

Сложные смеси, компоненты которых существенно различаются по коэффициентам емкости, невозможно разделить в течение приемлемого времени, если проводить элюирование одной и той же смесью растворителей, т.е. в изократическом режиме. Для одинаково хорошо-

го разделения слабо и сильно удерживаемых компонентов и получения хорошо различимых пиков состав элюента необходимо постоянно менять. Такой режим называется *градиентным*. При таком элюировании увеличивается скорость разделения, но ухудшается разрешение. Кроме того, вследствие того, что состав смеси постоянно меняется, невозможно использовать теорию эквивалентных теоретических тарелок, а значит, не могут быть рассчитаны многие хроматографические параметры, рассчитываемые при рассмотрении хроматографического разделения в изократическом режиме.

Пусть в обращенно-фазовой хроматографии в качестве подвижной фазы в изократическом режиме используется смесь растворителя с малой элюирующей силой (например, вода) и большей элюирующей силой (например, ацетонитрил). Тогда для многих веществ зависимость фактора удерживания от объемной доли φ растворителя с большей элюирующей силой описывается следующим уравнением (модель линейного изменения элюирующей силы растворителя):

$$\log_{10} k = \log_{10} k_w - S \cdot \varphi, \quad (99)$$

где S – константа, которая зависит от природы исследуемого вещества, природы подвижной фазы и используемой колонки (если используется одна и та же колонка и система одних и тех же растворителей, например, ацетонитрил–вода, то S зависит только от исследуемого вещества).

Для веществ, для которых выполняется модель линейного изменения элюирующей силы растворителя, время выхода из колонки в градиентном режиме (объемная доля φ меняется линейно от φ_0 до $\varphi_0 + \Delta\varphi$, за время t_G) может быть предсказано по следующей формуле:

$$t_R = t_D + t_0 + \frac{t_0}{b} \cdot \log_{10}(2.3 \cdot k_0 \cdot b), \quad (100)$$

t_D – мертвое время движения подвижной фазы от смесителя до входа в колонку,

t_0 – мертвое время колонки,

k_0 – фактор удерживания в изократическом режиме при объемной доле φ_0 растворителя с большей элюирующей силой,

$b = \frac{t_0 \cdot S \cdot \Delta\varphi}{t_G}$ – скорость нарастания градиента.

2.8. Метод внешнего стандарта или абсолютной калибровки

Метод внешнего стандарта применяется для определения концентраций веществ, разделяемых на хроматографической колонке. Для

этого необходимо получить ряд хроматограмм химически чистых образцов (стандартов) с различными, заранее известными концентрациями. Затем для каждого вещества строят график зависимости высоты или площади пика от концентрации. Обычно калибровочные графики линейны и экстраполируются через начало координат, калибровочный коэффициент S является тангенсом угла наклона калибровочного графика. Неизвестная концентрация вещества определяется из соотношения

$$x = h_x/s, \quad (101)$$

h_x – высота пика интересующего компонента, мм,
 s – калибровочный коэффициент.

Основной источник погрешности такой калибровки – равномерность и длительность ввода образца. Точные количественные измерения проводят в изократическом режиме. При градиентном режиме получают воспроизводимые результаты, но иногда наблюдается смещение базовой линии и появление ложных пиков из-за наличия в используемых растворителях воды или других примесей.

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ УСТАНОВКА

3.1. Основные компоненты хроматографа

Принцип действия любого хроматографа заключается в следующем: раствор анализируемой смеси с помощью узла ввода пробы вводится в верхнюю часть хроматографической колонки. С помощью насоса анализируемая смесь прокачивается элюентом (подвижной фазой – ПФ) через хроматографическую колонку, в которой происходит разделение анализируемой смеси на отдельные вещества. Элюат, содержащий отдельные компоненты анализируемой смеси, на выходе из колонки регистрируются детектором, показания которого фиксируются и обрабатываются регистратором (ПК).

Хроматографические колонки, предназначенные для ВЭЖХ, представляют собой снабженные торцевыми соединениями трубки, заполненные тонкозернистым упаковочным материалом (насадкой). С обеих сторон трубки закрыты фильтрами для предотвращения высыпания сорбента.

В настоящей работе используется колонка «Биохиммак Диасфер» с обращенной фазой C_{18} (табл. 1).

Характеристики колонки «Биохиммак Диасфер» – С₁₈

Размер колонки	4,0 мм × 250 мм
Размер зерна	5 мкм
Диапазон pH	2–8
Максимально допустимая температура	70 °С
Максимальное давление	300 бар

На рис. 17 представлено устройство жидкостного хроматографа Perkin Elmer Series 200.

1) PE Series 200 Autosampler – автоматическая система отбора проб, позволяющая выбирать метод, который может состоять из программируемой серии отбора определенного объема исследуемых образцов или одиночного закола (рис. 18, табл. 2).

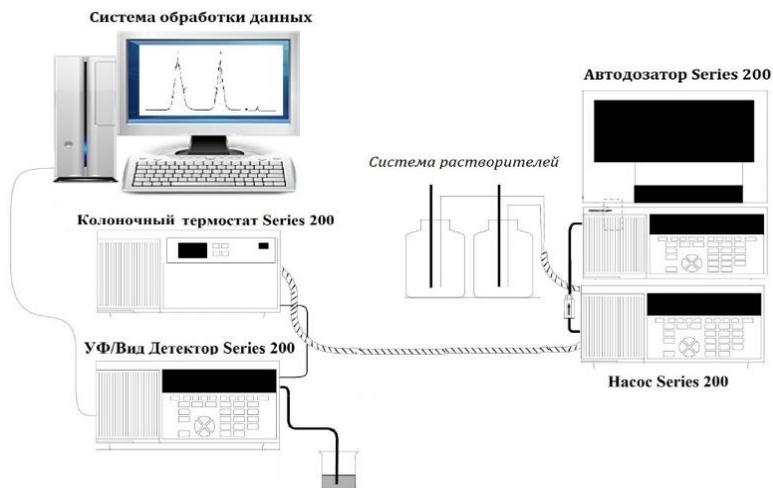


Рис. 17. Блок-схема жидкостного хроматографа Perkin Elmer Series 200

Таблица 2

Характеристики PE Series 200 Autosampler

Характеристики	Значения
Закол	0,1 мкл – 2,5 мл
Точность	< 0,5% RSD* области пика от 3 мкл
Минимальный объем образца	1 мкл в 7 мкл
Выбросы	< 0,02%

*RSD – Relative Standard Deviation.

2) Насос Series 200 – поршневой насос, способный работать в изократическом и градиентном режиме (рис. 18, табл. 3). В изократическом режиме предусмотрено изменение скорости потока растворителя, времени пропускания вещества через колонку, процентный состав подвижной фазы. В градиентном режиме, кроме всего, указывается вид кривой зависимости состава растворителя от времени.

Таблица 3

Характеристики PE Series 200 Pump

Характеристики	Значения
Диапазон давлений	0–420 бар
Скорость потока	0,01–10 мл/мин
Точность установки потока (Precision)	до 0,3% RDS при потоке воды 1 мл/мин и давлении 100 psi (70 бар)
Точность потока результирующая (Accuracy)	± 1% при потоке воды 1 мл/мин и давлении 100 psi (70 бар)
Диапазон концентраций растворителя	0–100%
Точность установки концентраций (Accuracy)	± 1% при 3–97% и 5 мл/мин
Точность концентрации результирующая (Precision)	< 0,2%
Градиентная кривая	линейная, экспоненциальная от 1 до 9,9 и от –9,9–1
Время шага	0–999 мин

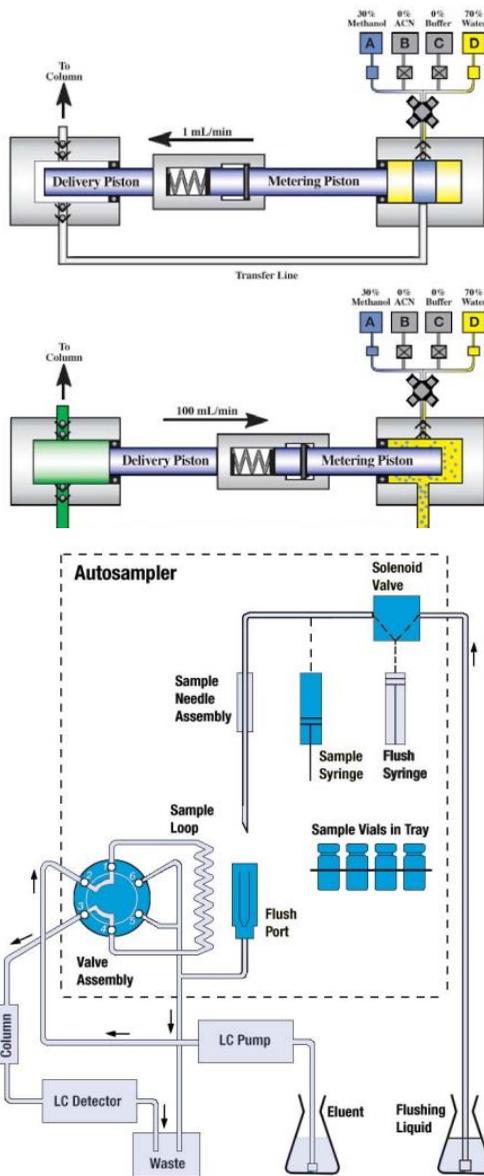


Рис. 18. Принцип работы поршневого насоса системы смешения элюэнта и автосэмплера в хроматографе Perkin Elmer Series 200

3) УФ/Вид детектор Series 200 относится к классу аналитических приборов, известных как спектрофотометры (табл. 4). Этот класс оптических приборов определяет коэффициент пропускания света через кювету, содержащую раствор анализируемых веществ. Свет, прошедший через кювету, собирается и преобразуется в электрический ток с помощью кремниевых фотодиодов. Ток на фотодиоде прямо пропорционален количеству фотонов, падающих на фотодиод. Затем ток преобразуется в напряжение, величина которого связана с оптической плотностью анализируемого раствора.

В основе работы УФ/Вид детектора Series 200 лежит закон Бугера–Ламберта–Бэра:

$$I = I_0 e^{-\varepsilon Cl}, \quad (102)$$

где I_0 – интенсивность входящего пучка, ε – показатель поглощения для раствора единичной концентрации вещества на определенной длине волны излучения, C – концентрация вещества, l – толщина слоя вещества, через который проходит свет.

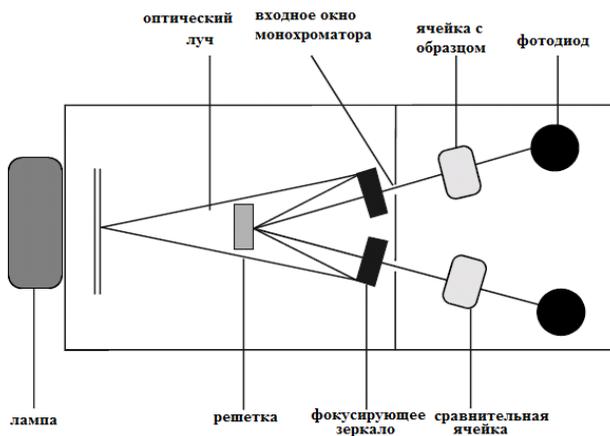


Рис. 19. Схема UV-детектора

Оптическая плотность, измеряемая прибором, это:

$$D = -\ln \left(\frac{I}{I_0} \right) = \varepsilon Cl. \quad (103)$$

При фиксированных ε и l получаем линейную зависимость оптической плотности от концентрации. Однако данная зависимость остается линейной только в том случае, если используемый пучок света монохроматический, а значение оптической плотности невысоко. К нелинейности могут привести такие факторы, как подготовка образца,

инжектирование, высокая концентрация образца в пробе, обратимая и необратимая адсорбция на колонке, широкая спектральная полоса пропускания и фон, создаваемый подвижной фазой.

В детекторе 200 UV/VIS реализован двулучевой оптический дизайн (рис. 19), который включает в себя: источник света – дейтериевую (для диапазона 190–360 нм) или вольфрамовую лампу (360–700 нм), монохроматор (в качестве диспергирующего элемента используется дифракционная решетка), ячейку с образцом и сравнительную ячейку, пару кремниевых фотодиодов.

Таблица 4

Характеристики УФ/Вид детектора Series 200

Характеристики	Значения
Диапазон длин волн	190–700 нм
Точность	± 1 нм
Шумы	$< \pm 1 \cdot 10^{-5}$ AU**, 210–280 нм

**AU – Absorbance Unit (оптическая плотность).

4) Колоночный термостат Series 200 контролирует температуру колонки, его основные характеристики представлены в табл. 5.

Таблица 5

Характеристики колоночного термостата Series 200

Характеристики	Значения
Диапазон температур	5–90 °С
Рекомендованная скорость потока	до 5 мл/мин
Устойчивость	± 1 °С
Точность	± 0,2 °С
Стабильность	0,2 °С
Скорость охлаждения и нагревания	до 5 °С/мин
Время стабилизации температуры	30 мин после установки

4. ПОРЯДОК ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТЫ

1. Включите все модули хроматографической системы.
2. Погрузите капилляры для растворителей в соответствующие емкости (А – вода, В – ацетонитрил, С – вода, D – вода, тонкий капилляр для промывки иглы нужно погрузить в воду).

3. Откройте дверцу на панели насоса и открутите (1,5 оборота) сливной клапан.
4. Для удаления воздуха из линий подачи подвижных фаз произведите прокачку каждой из них. Для этого подсоедините к сливному клапану шприц и прокачайте по 15 мл каждой фазы через систему: на панели насоса нажмите кнопку «Purge», при помощи кнопок F1–F8 выберите нужную фазу (А – вода, В – ацетонитрил, С – вода, D – вода) и задайте поток 5 мл/мин. Для остановки насоса нажмите кнопку «Stop». После удаления воздуха из системы отсоедините шприц и закрутите сливной клапан.
5. Три раза промойте иглу автосэмплера при помощи кнопки «Flush».
6. Далее установите 100% – процент потока фазы В, скорость потока поток – 2 мл/мин (F2) и включите насос (F8) на одну минуту, чтобы прокачать капилляры, находящиеся после насоса.
7. Подсоедините хроматографическую колонку.
8. Установите температуру термостата 40 °С.
9. Установите 100% В, поток 0,7 мл/мин (F2) и включите насос (F8) на 7 минут, чтобы уравновесить колонку.
10. Включите AZ–Y на детекторе (автоматическое обнуление детектора перед началом анализа).
11. Включите компьютер и запустите программу «Мультихром» (логин и пароль для входа «student»).

5. ЗАДАНИЯ

Определение мертвого времени колонки

Для этого оцените время выхода NaCl при 100% В (NaCl не задерживается колонкой при данных условиях).

1. Установите на насосе значение потока 1,0 мл/мин, время анализа 2 минуты, состав подвижной фазы 100% В и запустите насос.
2. На детекторе установите время анализа 2 минуты и значение длины волны равным 200 нм.
3. На автосэмплере задайте номер виалы, содержащей раствор NaCl, и установите объем пробы 2 мкл.
4. Нажмите на изображение самописца в окне программы и задайте время анализа 2 минуты.
5. Нажмите «Старт» в окне программы и введите имя файла. В имени файла укажите название образца, скорость потока и состав подвижной фазы.
6. Запустите анализ кнопкой «Start» автосэмплера.

7. Проверьте наличие соответствующего файла с отчетом в папке «Reports» (ярлык на рабочем столе).
8. Повторите эксперимент еще два раза.
9. Установите на насосе 50% В.
10. Включите насос и дождитесь полного уравнивания колонки подвижной фазой (минимум 7 минут).
11. Повторите эксперимент для 50% В ($\varphi = 0.5$), сравните результаты.
12. Вычислите среднее значение и погрешность.
13. Оцените фазовое отношение φ .

Модель линейного изменения элюирующей силы растворителя

Для этого снимите зависимость фактора удерживания для бензола и фенола при φ от 0.5 до 0.9 (записывайте значение давления для разных φ). Колонку необходимо уравнивать для каждого значения φ !

1. Установите на насосе значение потока 1,0 мл/мин, время анализа 40 минут, состав подвижной фазы 50% В и запустите насос.
2. При необходимости дождитесь полного уравнивания колонки подвижной фазой (минимум 7 минут).
3. На детекторе установите время анализа 40 минут и значение длины волны равным 254 нм.
4. Если предыдущий анализ был остановлен вручную, нажмите кнопку «Reset» на детекторе.
5. На автосэмплере задайте номер виалы, содержащей смесь бензола и фенола, и установите объем пробы 1 мкл.
6. Нажмите на изображение самописца в окне программы и задайте время анализа 40 минут.
7. Нажмите «Старт» в окне программы и введите имя файла. В имени файла укажите название образца, скорость потока и состав подвижной фазы.
8. Запишите значение давления.
9. Запустите анализ кнопкой «Start» автосэмплера.
10. Остановите анализ после выхода второго пика из колонки.
11. Проверьте наличие соответствующего файла с отчетом в папке «Reports» (ярлык на рабочем столе).
12. Повторите эксперимент для всех значений φ из диапазона от 0.5 до 0.9 с шагом 0.1.
13. Определите константу S . Предскажите время выхода бензола при $\varphi = 0$. Рассчитайте погрешности. Проведите эксперимент при $\varphi = 0.2$.

14. Определение фактор сопротивления колонки.
15. Повторите эксперимент для толуола.
16. Для бензола и фенола определите зависимость числа теоретических тарелок N , свободной энергией сорбции ΔG , селективности α и критерия разделения R_s от φ .
17. Проанализируйте изменение формы пика бензола/толуола при изменении φ . Объясните наблюдаемые закономерности.
18. Используя результаты п. 2, подберите оптимальные условия разделения в изократическом режиме для смеси бензол–толуол (1:1) и в градиентном режиме для смеси бензол–толуол–ксилол (1:1:1).

Экспериментальная проверка выполнения уравнения Ван-Деемтера

Для этого проведите анализ бензола и фенола при $\varphi = 0.5$ при различных потоках подвижной фазы в диапазоне от 0.4 мл/мин до 1.6 мл/мин.

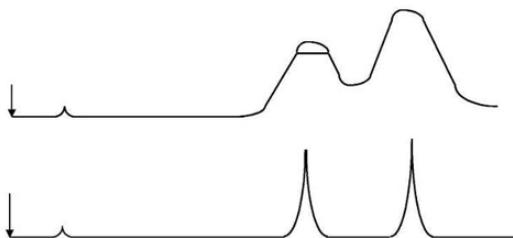
1. Установите на насосе значение потока 1,0 мл/мин, время анализа 40 минут, состав подвижной фазы 50% В и запустите насос.
2. При необходимости дождитесь полного уравнивания колонки подвижной фазой (минимум 7 минут).
3. На детекторе установите время анализа 40 минут и значение длины волны равным 254 нм.
4. Если предыдущий анализ был остановлен вручную, нажмите кнопку «Reset» на детекторе.
5. На автосэмплере задайте номер виалы, содержащей смесь бензола и фенола, и установите объем пробы 1 мкл.
6. Нажмите на изображение самописца в окне программы и задайте время анализа 40 минут.
7. Нажмите «Старт» в окне программы и введите имя файла. В имени файла укажите название образца, скорость потока и состав подвижной фазы.
8. Запустите анализ кнопкой «Start» автосэмплера.
9. Остановите анализ после выхода второго пика из колонки.
10. Проверьте наличие соответствующего файла с отчетом в папке «Reports» (ярлык на рабочем столе).
11. Повторите эксперимент для всех значений потока из диапазона от 0.4 до 1.6 мл/мин с шагом 0.2.
12. Постройте зависимость $H(F)$.
13. Сравните константу A с размером частиц сорбента. Сделайте выводы.

14. Определите D_m – коэффициент диффузии исследуемого вещества в подвижной фазе.
15. Определите оптимальную скорость потока для бензола, соответствующую максимальному числу теоретических тарелок. Объясните, почему предлагается проводить эксперименты при скорости потока 1 мл/мин.

6. ВОПРОСЫ И ЗАДАЧИ

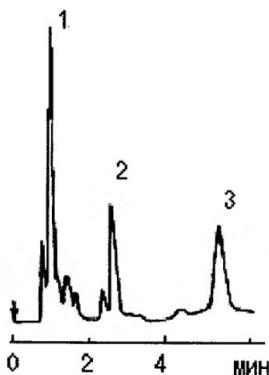
1. Какие особенности хроматографии позволяют достичь лучшего разделения веществ с близкими свойствами (в том числе изомеров) по сравнению с другими известными Вам методами разделения?
2. Перечислите особенности и преимущества высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Какие варианты метода используют в аналитической практике?
3. Сравните основные параметры хроматографического эксперимента в случае препаративной и аналитической хроматографии.
4. Какими методами можно идентифицировать соединения в смеси после их хроматографического разделения?
5. Перечислите основные положения концепции теоретических тарелок. В чем ее недостатки?
6. Как оценивают эффективность хроматографической колонки? Как величина эффективности отражается на форме хроматографического пика?
7. Какие типы колонок используют в хроматографии? Сравните их между собой.
8. Как зависит высота, эквивалентная теоретической тарелке, от скорости потока подвижной фазы?
9. Как влияет форма изотермы сорбции на форму хроматографического пика?
10. Какой параметр используется в жидкостной хроматографии для оптимизации условий хроматографического разделения?
11. От каких факторов зависит величина разрешающей способности в хроматографии?
12. Какие сорбенты используют в ВЭЖХ? Каким требованиям они должны отвечать?
13. Почему наиболее популярные сорбенты в ВЭЖХ – силикагель и особенно модифицированные силикагели? Каким образом проводят модификацию силикагеля?
14. Перечислите требования к подвижной фазе в ВЭЖХ.
15. Чем определяется элюирующая способность подвижной фазы в жидкостной хроматографии?

16. Как подбирают состав подвижной фазы в жидкостной хроматографии?
17. Что такое градиентный режим элюирования? Какими преимуществами он обладает по сравнению с изократическим элюированием?
18. Как влияет температура на эффективность и селективность разделения в жидкостной хроматографии?
19. Сравните два варианта ВЭЖХ – нормально-фазовый и обращенно-фазовый. Какие неподвижные и подвижные фазы используют в данных вариантах хроматографии?
20. Каков механизм разделения веществ в нормально-фазовой хроматографии?
21. Каков механизм разделения веществ в обращенно-фазовой хроматографии?
22. Какими закономерностями описывается удерживание веществ в нормально-фазовой и обращенно-фазовой ВЭЖХ?
23. Какой метод ВЭЖХ (нормально-фазовый или обращенно-фазовый) предпочтительнее использовать для разделения а) пептидов, б) жирорастворимых витаминов, в) водорастворимых витаминов, г) белков, д) липидов.
24. Как повлияет на форму пиков и эффективность разделения добавление кислоты (щелочи) в элюент?
25. Сравните принцип работы и возможности применения спектрофотометрического и флуориметрического детекторов в ВЭЖХ.
26. За счет подбора условий разделения удалось изменить α с 1,1 до 1,2. Во сколько раз при этом увеличится разрешающая способность?
27. В результате экспериментов были получены две хроматограммы.



- Какой параметр изменили для получения второй хроматограммы?
28. Была получена хроматограмма витаминов в пищевых продуктах, полученная на колонке с нуклеосилом NH_2 (250×4 мм, зернение 10 мкм), ПФ гептан–хлороформ (80:20), расход 3,5 мл/мин, 254 нм,

проба – 5 мкл. На хроматограмме присутствует пик, соответствующий ацетату витамина А, витамину D₃ и витамину Е. Определите последовательность выхода веществ из колонки.



Литература

1. Даванков В.А. Хроматография. Основные понятия. Терминология. М.: Российская академия наук, 1997.
2. Ettre L.S. Nomenclature for chromatography (IUPAC Recommendations 1993) // *Pure Appl. Chem.* 1993. V. 65, N 4. P. 819–872.
3. Ettre L.S. Chromatography: The separation technique of the 20th century // *Chromatographia.* 2000. V. 51, N 1–2. P. 7–17.
4. Ettre L.S. MS Tswett and the invention of chromatography: article // *LC GC North Am. Advanstar Communications*, 2003. V. 21, N 5. P. 458–467.
5. Цвет М.С. О новой категории адсорбционных явлений и о применении их к биохимическому анализу // *Труды Варшавского общества естествоиспытателей, отд. биологии.* 1903. Т. 14. С. 20–29.
6. Ettre L.S., Sakodyskii K.I. M. S. Tswett and the discovery of chromatography I: Early work (1899–1903) // *Chromatographia.* 1993. V. 35, N 3–4. P. 223–231.
7. Martin A.J.P., Synge R.L.M. A new form of chromatogram employing two liquid phases // *Biochem. J.* 1941. V. 35, N 12. P. 1358–1368.
8. Spackman D.H., Stein W.H., Moore S. Automatic Recording Apparatus for Use in Chromatography of Amino Acids // *Anal. Chem.* 1958. V. 30, N 7. P. 1190–1206.
9. Cazes J., Scott R.P.W. *Chromatography theory: book.* CRC Press, 2002.

Учебное издание

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ
ХРОМАТОГРАФИЯ

Учебно-методическое пособие

Составители: **Никулин** Сергей Вячеславович,
Стародубцева Наталия Леонидовна,
Попов Игорь Алексеевич

Редактор *Л.В. Себова*. Корректор *О.П. Котова*
Компьютерная верстка *Л.В. Себова*

Подписано в печать 15.05.2017. Формат 60 × 84 ¹/₁₆. Усл. печ. л. 3,0.
Уч.-изд. л. 2,8. Тираж 150 экз. Заказ № 143.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Московский физико-технический институт
(государственный университет)»,
141700, Московская обл., г. Долгопрудный, Институтский пер., 9
Тел. (495) 408-58-22, e-mail: rio@mipt.ru

Отдел оперативной полиграфии «Физтех-полиграф»
141700, Московская обл., г. Долгопрудный, Институтский пер., 9
Тел. (495) 408-84-30, e-mail: polygraph@mipt.ru