



МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

«Казанский национальный исследовательский технологический университет»
Аналитический исследовательский центр

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Методические указания к лабораторной работе

Казань, 2021

УДК 543.544

Составитель: Саяхов Р.И., Кривошеев Е.А.

Высокоэффективная жидкостная хроматография. Методические указания к лабораторной работе. - Метод. указания /Казан. нац. иссл. технол. ун-т; Сост.: Р.И. Саяхов, Е.А. Кривошеев. Казань, 2021 - 18 с.

В данной работе рассматриваются физико-химические основы хроматографического анализа, принцип работы жидкостных хроматографов и обработка полученных результатов. Кроме того, предлагается практическая работа по изучению основ работы на жидкостном хроматографе PerkinElmer Flexar и определению основных хроматографических параметров.

Методическое указание предназначено для студентов, магистров, аспирантов ФГБОУ ВО «КНИТУ».

СОДЕРЖАНИЕ

	с.
1 Основные положения хроматографии	4
2 Высокоэффективная жидкостная хроматография	7
2.1 Нормально-фазовая ВЭЖХ	8
2.2 Обращенно-фазовая ВЭЖХ	9
3 Устройство жидкостного хроматографа	11
4 Порядок подготовки хроматографа к работе	14
5 Лабораторные работы	14
5.1 Определение мертвого времени колонки.	14
5.2 Определение основных хроматографических параметров	15
6 Вопросы	17
7 Литература	17
Приложение	18

1 Основные положения хроматографии

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

Компоненты анализируемой смеси (**сорбаты**) вместе с подвижной фазой передвигаются вдоль стационарной фазы. Ее обычно помещают в стеклянную или металлическую трубку, называемую колонкой. В зависимости от силы взаимодействия с поверхностью сорбента (за счет адсорбции или по какому-либо другому механизму) компоненты будут перемещаться вдоль колонки с разной скоростью. Одни компоненты останутся в верхнем слое сорбента, другие, в меньшей степени взаимодействующие с сорбентом, окажутся в нижней части колонки, а некоторые и вовсе покинут колонку вместе с подвижной фазой (такие компоненты называются неудерживаемыми, а время их удерживания определяет “мертвое время” колонки).

Многочисленные методы классифицируются по агрегатному состоянию фаз, механизму разделения и технике проведения разделения.

Для решения аналитических задач используется **элюентный** метод, он имеет следующие достоинства:

- дает наиболее полное разделение, поскольку зоны сорбатов разделены зонами элюента;
- сорбент непрерывно регенерируется;
- параметры удерживания хорошо воспроизводимы.

Элюентная хроматограмма, являющаяся зависимостью сигнала прибора (ось ординат) от времени или объема подвижной фазы (ось абсцисс), представляет собой совокупность пиков разделяемых компонентов. Обычно отдельный пик представляет собой гауссову кривую. Типичная хроматограмма приведена на рис. 1.

Рассмотрим основные хроматографические параметры, характеризующие поведение вещества в колонке (рис. 1). Время от момента ввода анализируемой пробы до момента регистрации максимума хроматографического пика называют **временем удерживания** и обозначают – **t_R**. Время удерживания складывается из двух составляющих – времени пребывания веществ в подвижной фазе (**t_m**) и времени пребывания в неподвижной фазе (**t_s**)

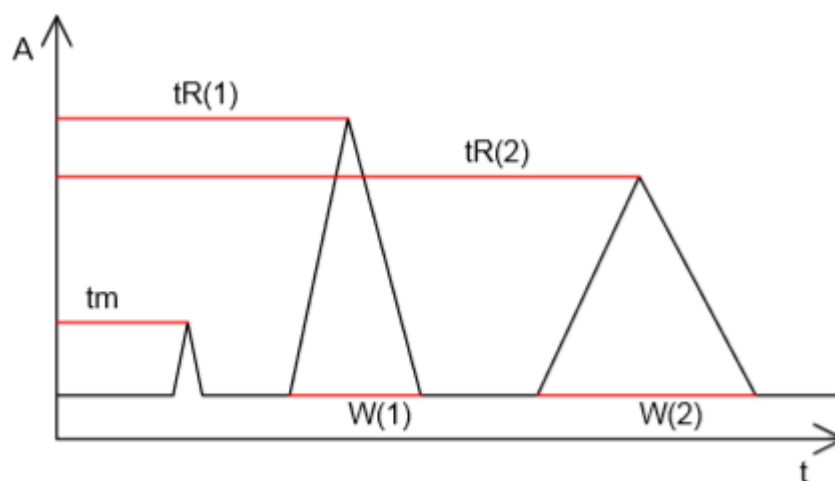


Рисунок 1- Хроматограмма смеси двух веществ

Значение **tm** фактически равно времени прохождения через хроматограф несорбируемого компонента. Значение **tR** не зависит от количества пробы, вводимой в колонку, но зависит от природы вещества и сорбента (если изотерма сорбции вещества линейна), а также от упаковки сорбента и может меняться от колонки к колонке. Поэтому для характеристики истинной удерживающей способности колонки следует ввести **исправленное время удерживания (t^{R})**

$$t^{\text{R}} = tR - t_m \quad (1)$$

Часто для характеристики удерживания используют **удерживаемый объем – VR** – объем подвижной фазы, который нужно пропустить через колонку с определенной скоростью, чтобы элюировать вещество:

$$V_R = F \cdot tR \quad (2),$$

где **F** – объемная скорость потока подвижной фазы ($\text{см}^3/\text{с}$) или ($\text{мл}/\text{мин}$).

По полученной хроматограмме смеси (рис. 1) можно рассчитать экспериментальные значения хроматографических параметров: **фактор удерживания (емкости) (k)**, **коэффициент селективности (α)**, **разрешение (R_s)** и оценить **эффективность** хроматографической колонки.

Фактор удерживания k показывает во сколько раз дольше вещество пребывает в неподвижной фазе, чем в подвижной. Стараются выбирать условия хроматографического разделения таким образом, чтобы эта величина составляла от 1,5 до 4. **k** рассчитывают по формуле:

$$k = \frac{V_R - V_m}{V_m} = \frac{tR - t_m}{t_m} \quad (3)$$

Расстояние между максимумами хроматографических пиков определяет селективность неподвижной фазы. **Фактор разделения (коэффициент селективности) α** есть мера относительного удерживания или относительной подвижности двух разделяемых веществ, и описывается уравнением:

$$\alpha = \frac{t^R_2}{t^R_1} = \frac{D_2}{D_1} \quad (4)$$

Для разделения двух веществ необходимо подобрать условия разделения так, чтобы $D_1 \neq D_2$ и $\alpha > 1,00$.

Степень размывания хроматографического пика определяет эффективность колонки. Чем эффективнее колонка, тем уже пик, тем большее число компонентов можно разделить за более короткое время, т.е. время анализа сокращается. Количественно эффективность колонки может быть выражена **числом теоретических тарелок N**. Согласно концепции теоретических тарелок хроматографическую колонку представляют как ряд дискретных, соприкасающихся горизонтальных слоев (рис. 2), на которых мгновенно устанавливается равновесие между неподвижной и подвижной фазами, и акт сорбции-десорбции вещества повторяется многократно на каждом слое. Высота слоя – **высота, эквивалентная теоретической тарелке**, обозначается через **H**. Между параметрами существует соотношение:

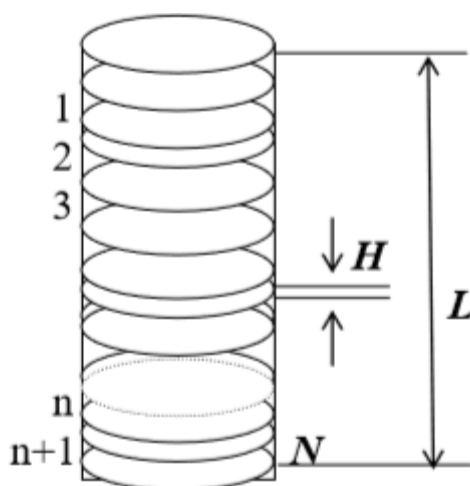
$$H = L / N \quad (5),$$

где **L** - длина колонки.

Из экспериментальных данных рассчитывают **N** по формуле:

$$N = 16 \left(\frac{t^R}{W} \right)^2 \quad (6),$$

где **W** – ширина пика у основания.



L – длина колонки; *H* – высота ВЭТТ; 1,2,...*n* – номер тарелки; *N* – общее количество теоретических тарелок

Рисунок 2 - Модель хроматографической колонки

Разделение двух соседних пиков характеризуется разрешением **Rs**. Разрешение является мерой полноты разделения двух веществ. Разделение считается полным, если **Rs** равно или больше 1,5. Суммарное влияние основных

параметров хроматографической колонки (эффективности, селективности и коэффициентов удерживания) на разрешение хроматографических пиков описывается уравнением:

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N_2} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_2}{1 + k_2} \right) \quad (7)$$

Таким образом, полнота разделения компонентов является функцией D , R_s , H и L .

Полученная хроматограмма анализируемой смеси позволяет определить ее качественный и количественный состав. Качественной характеристикой определяемых веществ являются их времена удерживания (объемы удерживания) и другие характеристики удерживания (t'_R , V'_R , k , индексы удерживания). Для целей идентификации используют также корреляционные зависимости параметров удерживания с некоторыми физико-химическими свойствами соединений в гомологическом ряду (например, числом метиленовых групп, температурой кипения).

2 Высокоэффективная жидкостная хроматография

Жидкостная хроматография (ЖХ) - метод разделения и анализа сложных смесей веществ, в котором подвижной фазой является жидкость. Подвижная фаза в жидкостной хроматографии выполняет двоякую функцию: 1) обеспечивает перенос десорбированных молекул по колонке (подобно подвижной фазе в газовой хроматографии); 2) регулирует константы равновесия, а, следовательно, и удерживание в результате взаимодействия с неподвижной фазой (сорбируясь на поверхности) и с молекулами разделяемых веществ. В ЖХ природа подвижной фазы имеет существенно большее значение. В результате комбинации ограниченного числа сорбентов и неограниченного числа, различных по составу, подвижных фаз возможно решение чрезвычайно большого числа встречающихся на практике задач. Метод ЖХ применим для разделения значительно более широкого круга веществ, чем газовая хроматография, поскольку большая часть веществ не обладает летучестью, а многие вещества неустойчивы при высоких температурах.

В ЖХ разделение обычно происходит при комнатной температуре. ЖХ подразделяется на варианты в соответствии с характером основных проявляющихся межмолекулярных взаимодействий:

– в **ситовой хроматографии** разделение компонентов осуществляется за счет разницы в растворимости молекул при их прохождении (фильтрации) через слой сорбента;

– в **адсорбционной хроматографии** – за счет разницы в адсорбируемости молекул, проходящих через слой частиц сорбента, покрытых неподвижной фазой в виде тонкого слоя или поверхностнопривитых радикальных групп;

– в **ионообменной и ионной хроматографии** – за счет разницы в способности к обмену ионами с ионообменниками;

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

В зависимости от природы подвижной (ПФ) и неподвижной (НФ) фазы различают нормально-фазовую (НФХ) и обращенно-фазовую (ОФХ) хроматографию.

2.1 Нормально-фазовая ВЭЖХ

Разделение методом нормально-фазовой хроматографии осуществляется в результате взаимодействия вещества с адсорбентами, такими как силикагель или оксид алюминия, имеющими на поверхности активные центры (рис. 3). Различие в способности к взаимодействию с адсорбционными центрами различных молекул пробы приводит к их разделению на зоны в процессе движения по колонке. Достигаемое при этом разделение зон компонентов зависит от взаимодействия как с растворителем, так и с адсорбентом.

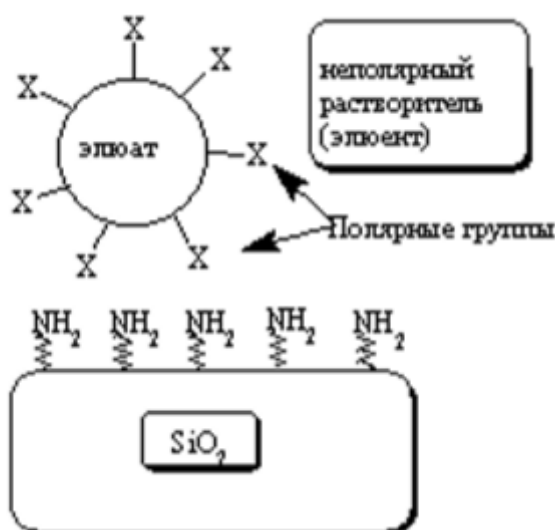


Рисунок 3 - Распределительная хроматография с привитой фазой (нормальнофазный вариант)

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.

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.

2.2 Обращенно-фазовая ВЭЖХ

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. 4)

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**:

– ОФ ВЭЖХ является очень гибким методом, так как, изменяя состав водноорганических смесей, используемых в качестве подвижной фазы, можно на одной колонке обеспечить разделение соединений различной природы;

– селективность данного метода почти всегда значительно выше, чем других вариантов хроматографии для всех соединений, кроме сильнополярных – при использовании гидрофобизированных силикагелей быстро устанавливается равновесие между подвижной и неподвижной фазой, эти сорбенты отличаются высокой эффективностью разделения;

– можно осуществлять разделение соединений, растворимых как в воде, так и в органических растворителях;

– возможность использования в подвижной фазе буферных растворов может улучшить селективность и эффективность разделения ионогенных соединений.

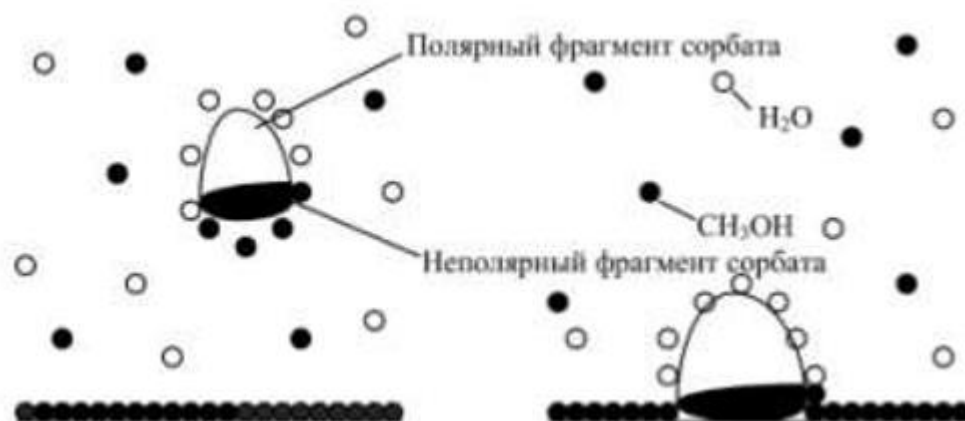


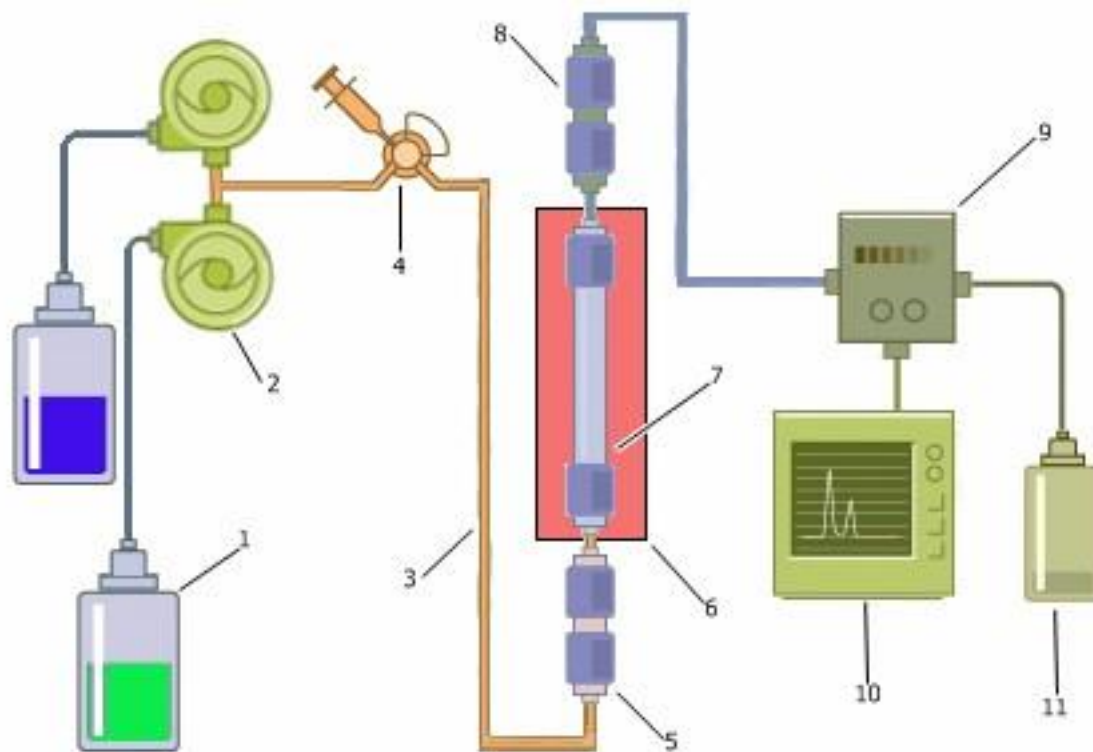
Рисунок 4 - Механизм сорбции при обращено-фазовой хроматографии

3 Устройство жидкостного хроматографа

Принцип действия любого хроматографа (рис. 5) 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. Вытекающий из колонки элюат, содержащий отдельные компоненты анализируемой смеси, детектируется детектором, показания которого регистрируются 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.

Автосэмплер - автоматическая система отбора проб, позволяющая выбрать метод, который может состоять из программируемой серии отбора определенного объема исследуемых образцов или одиночного закола



(1) резервуар с растворителем и входным фильтром; (2) насос с датчиком давления; (3) трубопровод высокого давления; (4) ручной или

автоматический инжектор — автосемплер; (5) защитная предколонка; (6) термостат; (7) аналитическая колонка; (8) постколоночный реактор или блок пост-колоночной дериватизации; (9) детектор; (10) устройство сбора и обработки данных; (11) резервуар для отработанного растворителя.

Рисунок 5 - Устройство жидкостного хроматографа

Насос жидкостного хроматографа способен, как правило, работать в нескольких основных режимах элюирования:

- **Изократическим элюированием** называется использование элюента постоянного состава в течение всего анализа. Почти все (кроме хроматограмм, в условиях которых есть термин «градиент») приведенные в пособии хроматограммы получены именно в таком режиме. Достоинство изократического элюирования состоит в технической простоте исполнения и высокой воспроизводимости времен удерживания, площадей и высот пиков. Для хроматографии на силикагельных колонках такой вид элюирования является единственно возможным из-за сложности регенерации колонки.

- Одним из наиболее эффективных способов повышения качества разделения смесей является **градиентное элюирование**. Смысл приема заключается в увеличении по определенному закону элюирующей силы элюента в процессе одного анализа. В связи со сравнительно простой регенерацией для проведения градиентного элюирования используются колонки, заполненные обращенно-фазовым адсорбентом. Увеличение элюирующей силы происходит за счет повышения концентрации метанола или ацетонитрила в элюенте в процессе одного анализа. Градиентное элюирование полезно в том случае, если при использовании изократического элюирования невозможно добиться разделения всех компонентов, различающихся по временам удерживания

Наиболее распространенными **детекторами** в адсорбционной ВЭЖХ являются:

А) **Спектрофотометрический**. В процессе элюирования веществ в специально сконструированной микрокювете измеряется оптическая плотность элюата при заранее выбранной длине волны, соответствующей максимуму поглощения определяемых веществ. Такие детекторы измеряют поглощение света в ультрафиолетовой или видимой области спектра, причем первый вариант используется чаще. Это связано с тем, что большинство химических соединений имеют достаточно интенсивные полосы поглощения в диапазоне длин волн 200-360 нм. Фотометрические детекторы имеют достаточно высокую чувствительность. Широкая область линейности детектора позволяет анализировать как примеси, так и основные компоненты смеси на одной хроматограмме. Возможности спектрофотометрического детектора существенно

расширились после появления его современного аналога – детектора на диодной матрице (ДДМ), работающего как в УФ-, так и видимой области. В таком детекторе «матрица» фотодиодов (их более 200) постоянно регистрирует поглощение электромагнитного излучения в режиме сканирования. Это позволяет снимать при высокой чувствительности неискаженные спектры быстро проходящих через ячейку детектора компонентов. По сравнению с детектированием на одной длине волны, сравнение спектров, полученных в процессе элюирования пика, позволяет идентифицировать разделяемые компоненты с гораздо большей степенью достоверности.

Б) Флуоресцентный. Принцип действия флуориметрического детектора основан на измерении флуоресцентного излучения поглощенного света. Поглощение обычно проводят в УФ-области спектра, длины волн флуоресцентного излучения превышают длины волн поглощенного света. Флуориметрические детекторы обладают очень высокой чувствительностью и селективностью. Наиболее важная область их применения – детектирование ароматических полициклических углеводов.

В) Рефрактометрический. В отличие от фотометрических детекторов, реагирующих только на вещества, поглощающие свет в ультрафиолетовой, видимой и инфракрасной области спектра, рефрактометрические детекторы являются универсальными. Они особенно полезны, когда вещества не имеют интенсивного поглощения в УФ свете, не флуоресцируют и не обладают электрохимической активностью. Их принцип действия основан на дифференциальном измерении показателя преломления чистого растворителя и раствора анализируемого вещества в этом растворителе. Вклад растворенного вещества в изменение показателя преломления растворителя пропорционален объемной концентрации этого вещества, причем растворитель также является детектируемым веществом, так как имеет определенный показатель преломления. Данные детекторы обладают средней чувствительностью, их показания в сильной степени зависят от колебаний параметров, влияющих на состав подвижной фазы, таких как давление, температура и концентрация анализируемого вещества. Поэтому рефрактометрический детектор мало пригоден для градиентной хроматографии.

Г) Кондуктометрический. Данный детектор используют для определения неорганических анионов и катионов в ионной хроматографии. Принцип его работы основан на измерении электропроводности подвижной фазы в процессе элюирования вещества.

Д) Масс-спектрометрический. Данный детектор является исключительно информативным, поскольку обладает высокой чувствительностью и селективностью. Основная проблема, затрудняющая использование этого

детектора, проблема ввода потока элюента в масс-спектрометр. Развитие микроколоночной хроматографии позволяет разработать системы прямого ввода потока элюента в ионный источник масс-спектрометра. Используют масс-спектрометры высокого разрешения и достаточного быстродействия с химической ионизацией при атмосферном давлении или ионизацией с применением электрораспыления. Последние модели масс-спектрометров для жидкостной хроматографии работают в диапазоне масс m/z от 20 до 4000 а.е.м. Масс-спектрометрический детектор предъявляет жесткие требования к чистоте растворителей, является дорогостоящим и сложным в обращении.

4 Порядок подготовки хроматографа к работе

1. Включить все модули хроматографической системы Flexar.
2. Включить компьютер и запустить программу Chromera. Выбрать нужную конфигурацию и нажать Launch. Дождаться инициализации всех модулей.
3. Погрузить капилляры для растворителей в соответствующие емкости (А – вода, В – ацетонитрил, С – вода, D – вода, тонкий капилляр для промывки автосэмплера – вода).
4. Открыть панель на блоке насоса, подсоединить к сливному клапану стандартный шприц и открутить (3-4 оборота) дренажный клапан.
5. Прокачать по 30 мл каждого растворителя. Для этого на панели насоса нажать кнопку, соответствующую нужной емкости (А-D). Для остановки насоса повторно нажать на кнопку.
6. Параллельно 5 раз промыть иглу автосэмплера при помощи кнопки Flush в вкладке Manual Control программы Chromera.
7. После заполнения всех линий и удаления пузырей, закрыть дренажный клапан и отсоединить шприц.
8. Далее в вкладке Manual Control установить состав потока 100% В, скорость потока 0,5 мл/мин и включить насос, чтобы прокачать капилляры, находящиеся после насоса и уравновесить систему.
9. Установить температуру термостата 30 °С.
10. Дать прогреться детектору хроматографа не менее 1 часа.

5 Лабораторные работы

5.1 Определение мертвого времени колонки

Цель работы: Оценить время выхода NaCl при 100% В (NaCl не задерживается колонкой при данных условиях).

1. Отобрать раствор NaCl, предоставленный преподавателем, в аналитическую виалу и поместить её в автосэмплер хроматографа.
2. В программе Chromera во вкладке Method установить для насоса значение потока 0,5 мл/мин, время анализа 3 минуты, состав подвижной фазы 100% В, режим работы - изократический.
3. Во вкладке Method для детектора установить время анализа 3 минуты и значение длины волны равным 200 нм. Сохранить полученный метод.
4. Во вкладке Sequence задать номер виалы, содержащей раствор NaCl, установить объем вводимой пробы 5 мкл. В качестве метода анализа, указать созданный ранее метод. Задать имя полученному анализу и сохранить.
5. Во вкладке Run в окне Sequence открыть созданный анализ. Проверить ещё раз все данные и запустить анализ - нажать на кнопку Start Sequence (зеленый треугольник).
6. После завершения анализа, проверить наличие соответствующего файла с отчетом во вкладке Post Run. Оценить полученный результат.
7. Повторить эксперимент еще два раза.
8. Открыть созданный ранее метод и установить состав потока 50% А и 50% В.
10. Во вкладке Run в окне Manual Control установить для насоса состав потока 50% А и 50% В, скорость потока 0,5 мл/мин. Включить насос и дождаться полного уравнивания колонки подвижной фазой (минимум 10 минут)
11. Повторите эксперимент для состава потока 50% А и 50% В, сравните результаты.
12. Вычислите среднее значение и погрешность

5.2 Определение основных хроматографических параметров

Цель работы: Определить основные хроматографические параметры, характеризующие поведение смеси углеводов в колонке, и оценить её разрешение и число теоретических тарелок.

1. Отобрать раствор углеводов, предоставленных преподавателем, в аналитическую виалу и поместить её в автосэмплер хроматографа.
2. В программе Chromera во вкладке Method установить для насоса значение потока 1 мл/мин, время анализа 20 минут, состав подвижной фазы 25% А и 75% В, режим работы - изократический.
3. Во вкладке Method для детектора установить время анализа 20 минут и значение длины волны равным 254 нм. Сохранить полученный метод.

4. Во вкладке Sequence задать номер виалы, содержащей раствор углеводов, установить объем вводимой пробы 5 мкл. В качестве метода анализа, указать созданный ранее метод. Задать имя полученному анализу и сохранить.

5. Во вкладке Run в окне Sequence открыть созданный анализ. Проверить ещё раз все данные и запустить анализ - нажать на кнопку Start Sequence (зеленый треугольник).

6. После завершения анализа открыть соответствующий файл с отчетом во вкладке Post Run.

7. Рассчитать исправленные времена удерживания ($t'R$) и удерживаемые объёмы (VR) для каждого из компонентов, соответственно по формулам (1) и (2).

8. Рассчитать остальные хроматографические параметры: K , α , H , N по формулам (3)-(6).

9. Рассчитать разрешение колонки.

10. Для удобства запись всех хроматографических параметров осуществляют в виде таблицы:

Вещество	tR	$t'R$	VR	$V'R$	K	N	H	Rs

Вопросы

1. Перечислите особенности высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Какие варианты метода используют в аналитической практике?

2. Как оценивают эффективность хроматографической колонки? Как величина эффективности отражается на форме хроматографического пика?

3. От каких факторов зависит величина разрешения?

4. Сравните два варианта ВЭЖХ – нормально-фазовый и обращенно-фазовый. Какие неподвижные и подвижные фазы используют в данных вариантах хроматографии?

5. Каков механизм разделения веществ в нормально-фазовой хроматографии?

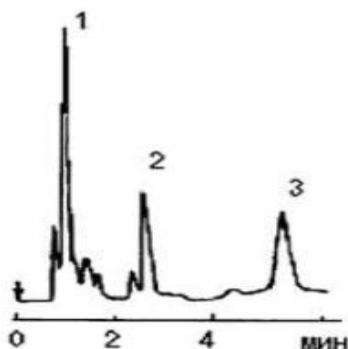
6. Каков механизм разделения веществ в обращенно-фазовой хроматографии?

7. Что такое градиентный режим элюирования? Какими преимуществами он обладает по сравнению с изократическим элюированием?

8. Какие типы детекторов используются в жидкостной хроматографии? Сравните их между собой.

9. Как можно идентифицировать соединений в смеси после их хроматографического разделения?

10. Была получена хроматограмма витаминов в пищевых продуктах, полученная на колонке с нуклеосилом NH₂ (250x4 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. Определить последовательность выхода веществ из колонки.



Литература

1. Рабочая инструкция по проведению работ на жидкостном хроматографе PerkinElmer Flexar.
2. Инструкция по охране труда при работе на жидкостном хроматографе PerkinElmer Flexar.
3. Высокоэффективная жидкостная хроматография: учебное пособие для вузов / С.Н. Сычев. – Орел: ОрелГТУ, 2010. – 148 с.
4. Хроматографические методы анализа. Методическое пособие для специального курса. — МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 2007. — 204 с.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Свойства используемых в хроматографии растворителей

Растворитель	ε'	ε	u	δ	η°	γ	T_λ
<i>n</i> -Пентан	0,00	1,927	0,0	7,1	1,358	0,23	210
Циклогексан	0,03	2,02	0,0	8,2	1,427	1,0	210
Четыреххлористый углерод	0,14	2,238	0,0	8,6	1,466	0,97	265
Бензол	0,25	2,275	0,0	9,2	1,501	0,80	276
Этиловый эфир	0,29	4,22	1,22	7,4	1,353	0,23	220
Хлороформ	0,31	4,724	1,2*	9,3	1,443	0,57	245
Метиленхлорид	0,32	8,93	1,55	9,7	1,424	0,44	245
Ацетон	0,43	20,74	2,78	9,9	1,359	0,32	330
Диоксан	0,43	2,21	0,4	10,0	1,422	1,54	220
Этилацетат	0,45	6,06	1,81	9,6	1,370	0,45	260
ДМСО	0,48	-	3,90	12,8	-	2,24	265
Диэтиламин	0,49	-	1,13	-	1,387	0,38	275
Ацетонитрил	0,50	34,4	3,4	11,7	1,344	0,37	210
<i>n</i> -Пропанол	0,63	19,7	1,65	11,5	1,380	2,3	210
Метанол	0,72	32,65	1,66	14,4	1,329	0,6	210
Этиленгликоль	> 1	-	2,30	14,7	1,372	19,9	-
Вода	> 1	78,3	1,76	-	1,333	-	200
Уксусная к-та	> 1	6,19	1,77	12,4	1,372	1,26	248

* дипольный момент измерен методом Штарка.

Примечание:

ε' – элюирующая сила растворителя при хроматографии на силикагеле; ε – диэлектрическая проницаемость;

u – дипольные моменты в Дебаях (D), измеренные в бензольном растворе;

δ – параметр растворимости Гильдебрандта (Дж/см);

η° – показатель преломления;

γ – вязкость при 20 °С (кПа·с);

T_λ – УФ-пропускание (1 %) слоя 10 мм при длине волны λ , нм.