



МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

«Казанский национальный исследовательский технологический университет»
Аналитический исследовательский центр

ИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Методические указания к лабораторной работе

Казань, 2021

УДК 543.544

Составитель: Саяхов Р.И., Хацринова Ю.А.

Высокоэффективная жидкостная хроматография. Методические указания к лабораторной работе.- Метод. указания /Казан. нац. иссл. технол. ун-т; Сост.: Р.И. Саяхов, Ю.А. Хацринова. Казань, 2021 -15 с.

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

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

СОДЕРЖАНИЕ

	с.
1 Основные положения хроматографии	4
2 Ионная хроматография	7
2.1 Теоретические основы ионной хроматографии	8
2.2 Разделение анионов	10
3 Устройство ионного хроматографа	12
4 Порядок подготовки хроматографа к работе	13
5 Лабораторные работы	13
5.1 Определение массовых концентраций ионов	13
5.2 Определение основных хроматографических параметров	14
6 Вопросы	14
7 Литература	15

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 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 не удерживаемыми, 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**)

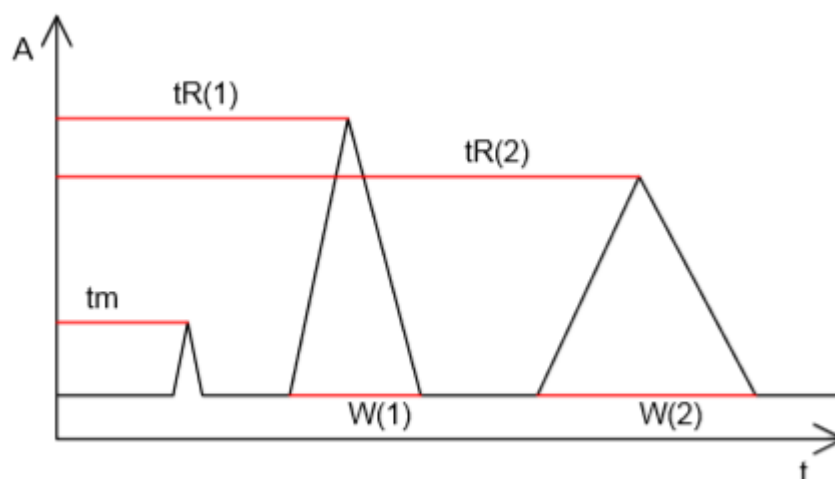


Рисунок 1 - Хроматограмма смеси двух веществ

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:

$$\alpha = \frac{t^R_{R2}}{t^R_{R1}} = \frac{D2}{D1} \quad (4)$$

Для разделения двух веществ необходимо подобрать условия разделения так, чтобы $D1 \neq D2$ 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:

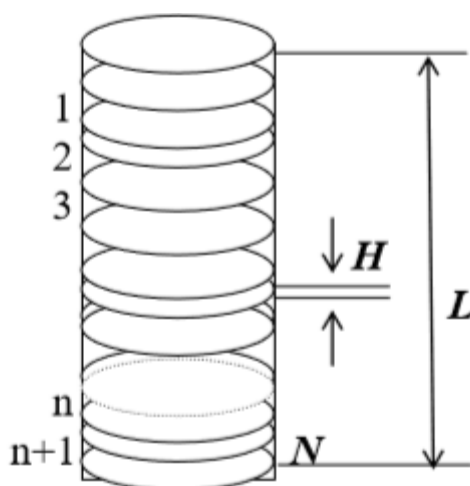
$$H = L / N \quad (5),$$

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 Ионная хроматография

Необходимость контроля нормативных показателей качества питьевой воды обусловлена влиянием антропогенных факторов (техногенные загрязнения) и увеличением эксплуатационной нагрузки популярных водоисточников. Вода является важнейшим сырьем при производстве многих напитков и продуктов питания. Анализ используемой воды очень важен как для контроля качества и вкуса продуктов питания, так и для обеспечения безопасности здоровья. Природная вода различных источников имеет свои особенности, и компоненты могут существенно различаться по уровню концентраций - от долей мкг/л до единиц г/л.

Для определения содержания ионов в питьевой и природной водах, в том числе вод источников питьевого водоснабжения, используется метод ионной хроматографии.

Ионная хроматография (ИХ) – это вариант жидкостной хроматографии, включающий ионообменное разделение ионов и кондуктометрическое определение концентрации хроматографически разделенных ионов. Этот метод идеально подходит для анализа воды. Диапазоны концентраций неорганических анионов в водах могут быть исключительно широкими - от ничтожных содержаний в особо чистой воде до макрокonzентраций хлоридов в морской воде.

Ионная хроматография позволяет определять неорганические и органические анионы, катионы щелочных и щелочноземельных металлов, катионы переходных металлов, амины и другие органические соединения в ионной форме. Этот метод идеально подходит для анализа воды. Диапазоны концентраций неорганических

анионов в водах могут быть исключительно широкими – от ничтожных содержаний в особо чистой воде до макрокonzентраций хлоридов в морской воде. Хотя для анализа воды используется множество различных методов – ионная хроматография во всем мире является приоритетным методом и обеспечивает многокомпонентное определение в любых водах. До появления ИХ не было эффективного метода определения ионов с такой чувствительностью, селективностью, воспроизводимостью и скоростью анализа. При этом анализ методом ИХ в большинстве случаев не требует пробоподготовки: при необходимости проба фильтруется и разбавляется. Анализ таких неорганических анионов, как **фторид-, хлорид-, нитрит-, нитрат-, сульфат- и фосфат-ионов** в водах методом ИХ многие годы является самым распространенным и рутинным анализом во всем мире.

ИХ является разновидностью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии для многокомпонентного анализа веществ ионной природы, либо тех соединений, которые в определенных условиях способны к ионизации.

Широкое распространение ИХ обусловлено **рядом ее достоинств**:

а) возможность определять очень большое число как неорганических, так и органических ионов, а также одновременно определять катионы и анионы;

б) высокая чувствительность определения (до 1 нг/мл без предварительного концентрирования);

в) высокая селективность и экспрессность (можно определить до 10 ионов за 10-15 минут, а при градиентном элюировании свыше 20 ионов за 25-30 мин);

г) малый объем анализируемой пробы (обычно 10-50 мкл), требуется не более 2 мл образца;

д) широкий диапазон определяемых концентраций (от 1 нг/мл до 1000 мг/л без разбавления);

е) при анализе водных проб в большинстве случаев пробоподготовка проста или же ее вообще не требуется.

2.1 Теоретические основы ионной хроматографии

В классической ионообменной хроматографии разделение происходит за счет обратимого ионного обмена. ИХ - аналитический вариант классической ионообменной хроматографии, ее отличает оперативность, большая эффективность и более высокая чувствительность анализа.

В основу действия ионного хроматографа положено объединение ионообменной хроматографии с детектированием по электропроводности и с компенсацией электропроводящего фона элюента.

Детекторы электропроводности пригодны для обнаружения самых разнообразных ионов. Такие детекторы не реагируют на вещества, находящиеся в

молекулярном состоянии (воду, этанол или недиссоциированные молекулы слабых кислот).

В ионной хроматографии в качестве сорбентов используются ионообменные смолы (ионообменники), содержащие в своей структуре ионогенные группы, способные к реакции ионного обмена (рис. 3). Основой современных ионообменников для ИХ являются силикагели и органические пористые полимеры. Последние в настоящее время доминируют, т.к. более стабильны в щелочных средах при $pH > 8$. Силикагели устойчивы в пределах $pH = 2-8$.



Рисунок 3 - Внешний вид ионообменных смол

Важной характеристикой ионообменника является его обменная емкость. **Ионообменная емкость** – это число ионообменных центров на грамм ионообменника, т.е. это количество подвижных ионов, которые смола способна высвободить для обмена. Емкость является мерой числа доступных для ионного обмена функциональных групп в смоле и выражается в мэкв/г сорбента. В ИХ с кондуктометрическим детектором используют ионообменники с низкой емкостью (менее $0,1 \text{ мэкв} \cdot \text{г}^{-1}$).

В зависимости от знака заряда функциональных ионогенных групп ионообменники делят на:

1) **катионообменники (катиониты)** – имеют на поверхности положительно заряженные ионы, способны их высвободить и сорбировать из подвижной фазы катионы. то есть способны к обмену катионами.

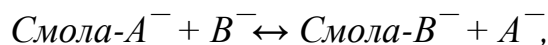
2) **анионообменники (аниониты)** – имеют на поверхности отрицательно заряженные группы и сорбируют из подвижной фазы анионы, то есть способны к обмену анионами.

Разделение анионов в основном проводят на анионообменниках полимерной основы с четвертичными аммонийными группами. Катионы разделяются на катионообменниках с сульфогруппами.

Ионообменная хроматография основана на обратимом процессе эквивалентного обмена между ионами анализируемого вещества, находящимися в

элюенте, и ионами ионогенных групп (противоионы), входящих в состав ионообменника:

Ионообменная хроматография основана на **обратимом процессе эквивалентного обмена** между ионами анализируемого вещества, находящимися в элюенте, и ионами ионогенных групп (противоионы), входящих в состав ионообменника:



где A^{-} и B^{-} – ионы одного знака (в данном примере анионы).

подавляющее большинство анализов в ИХ выполняют при применении в качестве элюентов разбавленных водных растворов сильных электролитов - кислот, щелочей и солей. Вода обладает прекрасными растворяющими и ионизирующими свойствами, т.е. растворяет анализируемые образцы и переводит их из молекулярной формы в ионную, что и требуется для анализа ионов.

2.2 Разделение анионов

Анализ неорганических и органических ионов в растворах – сложная аналитическая задача. Внедрение ИХ для этих целей явилось большим достижением во многих актуальных областях. Если для анализа катионов существуют альтернативные экспрессные и чувствительные методы (например, атомно-абсорбционная спектрометрия), то для анализа анионов они отсутствуют. Такой чувствительный и оперативный метод, как ИХ, позволяет определять все типы анионов. Схематичный пример анионного хроматографического анализа представлен на рис.4.

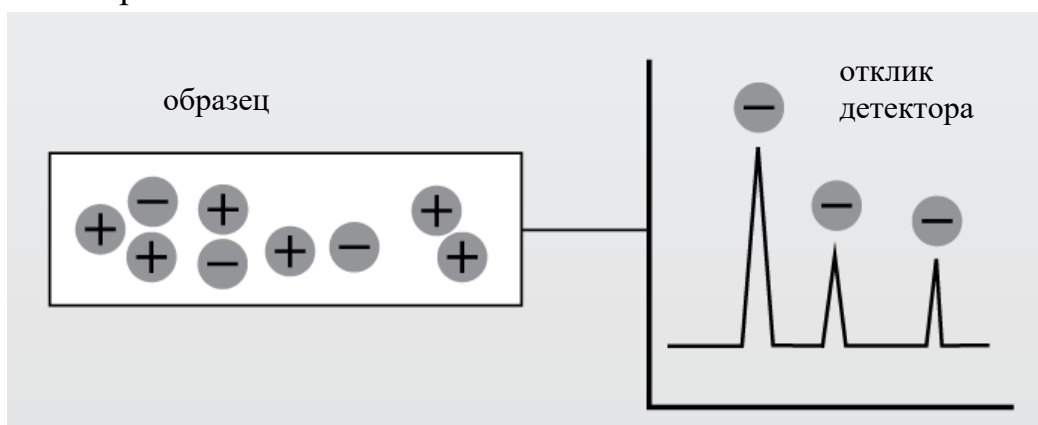


Рисунок 4 - Схематичный анализ анионного состава методом ИХ

Наиболее распространенными элюентами в двухколоночной ИХ анионов являются **разбавленные растворы солей слабых кислот**.

Выбор оптимального элюента зависит от сродства анализируемых ионов к ионообменнику в разделительной колонке и обусловлен в первую очередь тем, какие ионы нужно определить. Для анализа анионов наиболее часто в качестве элюентов используют NaHCO_3 (гидрокарбонат, или бикарбонат натрия) и Na_2CO_3

(карбонат натрия). Они дешевы, нетоксичны, устойчивы к окислению. Так как они отличаются по элюирующей силе, удобно использовать их смеси. Существует т.н. стандартный элюент: 0,0024 М Na_2CO_3 / 0,003М NaHCO_3 .

Анионы карбоната и гидрокарбоната являются **элюирующими ионами**. Анионы пробы и элюента конкурируют за фиксированные активные центры смолы. Ионы с более высоким сродством к смоле будут удерживаться на колонке дольше. Традиционно считается, что для разделения наиболее подходят элюенты, элюирующие ионы которых имеют несколько большую сорбционную способность, чем наиболее прочно удерживаемый ион компонента анализируемой смеси. Элюирующая сила элюента обусловлена не только сорбционными характеристиками элюирующих ионов, но и зависит от их концентрации. Изменяя концентрацию элюента, можно регулировать его элюирующую силу. На этом принципе основано градиентное элюирование. Элюенты по элюирующей силе делят на слабые, средние и сильные. Следует отметить, что деление элюентов по их элюирующей силе весьма условно, поскольку некоторые элюенты являются эффективными при разделении как слабо-, так и средне- и сильноудерживаемых ионов.

Элюирующую силу элюента можно изменять также, изменяя рН раствора. Наглядным примером увеличения элюирующей силы элюента с ростом его рН может как раз служить использование растворов карбонатов для разделения анионов. Чаще всего в анионной ИХ применяются элюенты, которые представляют собой буферные растворы, приготовленные смешением карбоната и гидрокарбоната натрия. Селективность такого элюента можно легко изменять, меняя соотношение компонентов, тем самым меняя значение рН элюента. Раствор гидрокарбоната является слабым элюентом и служит для разделения слабоудерживаемых анионов (фторид, нитрит, хлорид, сульфид, анионы монокарбоновых кислот и др.). В смешанной гидрокарбонат-карбонатной форме повышается рН раствора за счет увеличения содержания в нем карбонат-ионов, обладающих высокой элюирующей силой, что позволяет использовать эти элюенты для разделения среднеудерживаемых ионов (нитрат, сульфат, сульфит, дигидрофосфат, анионы дикарбоновых кислот и др.). А карбонатная форма элюента, существующая при высоких значениях рН, элюирует сильноудерживаемые анионы (иодид, тиоцианат, сульфат, полифосфаты, анионы дикарбоновых и трикарбоновых кислот и др.). Благодаря своему заряду карбонат имеет очень хорошие элюирующие свойства, и его можно использовать в сравнительно низких концентрациях.

3 Устройство ионного хроматографа

Основная особенность двухколоночного ионного хроматографа состоит в наличии подавительной колонки и кондуктометрического детектора, что позволяет реализовать наименьший предел детектирования за счет снижения фонового тока (рис. 5).

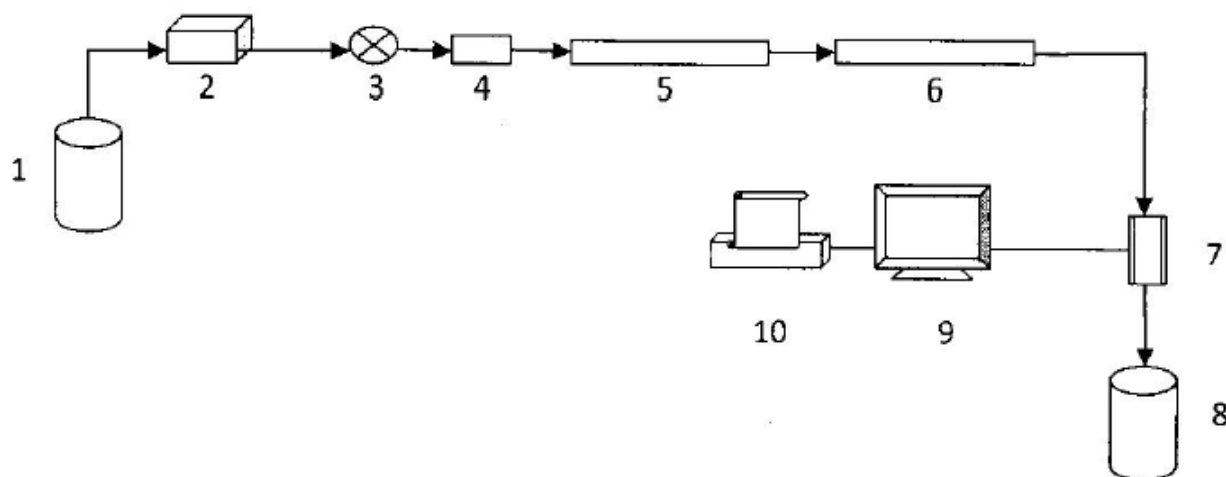
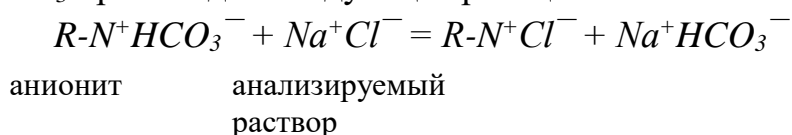


Рисунок 5 - Схема двухколоночного ионного хроматографа

Элюент из емкости 1 насосом 2 с постоянной скоростью прокачивается через дозирующий кран 3, защитную колонку (предколонка) 4, разделительную колонку 5, подавительную колонку 6, ячейку кондуктометрического детектора 7 и сливную емкость 8. Аналоговый сигнал от детектора преобразуется в цифровой и подается на ПК 9 для регистрации и обработки. Результаты разделения и анализа можно распечатать на принтере 10 в виде отчета, состоящего из хроматограммы с разделенными компонентами и таблицы с количественными результатами. Для стабильной работы разделительной колонки перед дозирующим краном устанавливают предварительную колонку (предколонку), улавливающую нежелательные примеси из элюента.

Разделительная колонка для анализа анионов заполнена анионообменником низкой обменной емкости с четвертичными аммониевыми функциональными группами, подвижные противоионы которых способны обмениваться на анализируемые анионы. Так при элюировании Cl^- -ионов раствором NaHCO_3 происходит следующая реакция ионного обмена:



Подавительная колонка заполнена катионообменником (сульфокатионитом) большой емкости в H^+ -форме. В подавительной колонке идет ряд реакций:

1) Подавление фона элюента - катионы натрия обмениваются с противоионами смолы подавительной колонки, в результате чего элюент превращается в угольную кислоту, которая слабо диссоциирует на ионы и обладает низкой электропроводностью.

2) Перевод анализируемых ионов в единую высокоэлектропроводящую форму. В результате этих процессов элюент переводят в малодиссоциированную кислоту, имеющую низкую электропроводность, а определяемые анионы – в сильную кислоту, имеющую высокую электропроводность, что увеличивает их детектируемость и исключает необходимость индивидуальных калибровочных графиков для каждой комбинации анион-катион в анализируемом растворе.

4 Порядок подготовки хроматографа к работе

1. Приготовить свежие растворы требуемой концентрации. Провести процедуры дегазации и фильтрации растворов.

2. Включить анионный хроматограф 881 Compact IC pro. Дождаться инициализации всех модулей.

3. Включить компьютер и запустить программу MagicIC. Открыть окно ручного управления модулей. Включить насосы, термостат колонки, дегазатор, супрессор.

4. Дождаться выхода хроматографа на режим (30-45 минут).

5. Открыть вкладку проведения анализа, в строке «Метод» выбрать «Регенерация 60 мин». В строке «Идентификатор» написать «регенерация». Нажать зелёную кнопку «Старт».

6. Если хроматограмма регенерации ровная и не содержит резких колебаний базовой линии или пиков, то прибор готов к работе. В противном случае, повторить пункт 5 до получения «чистой» хроматограммы.

5 Лабораторные работы

5.1 Определение массовых концентраций ионов

Цель работы: определить массовые концентрации анионов F^- , Cl^- и NO_3^- в питьевой воде методом двухколоночной ионной хроматографии с использованием кондуктометрического детектора.

1. Получить у преподавателя образец анализируемой воды, отобрать 5-8 мл в пластиковую пробирку и поместить её в автосэмплер хроматографа.

2. В программе MagicIC во вкладке проведения анализа в строке «Метод» выбрать «Vse anions-6». В строке «Идентификатор» указать Фамилию и номер группы. В строке «Позиция» указать номер позиции пробирки с образцом в

автосэмплере. В строке «Разбавление» указать 1. В строке «Объём вкола» указать 20 мкл. Нажать зелёную кнопку «Старт».

3. Дождаться завершения анализа.

4. После завершения анализа, открыть вкладку «Результаты» и найти хроматограмму проведённого анализа. Оценить полученные данные.

5. Повторить эксперимент еще два раза.

6. Вычислите среднее значение и погрешность

5.2 Определение основных хроматографических параметров

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

1. Получить у преподавателя образец анализируемой воды, отобрать 5-8 мл в пластиковую пробирку и поместить её в автосэмплер хроматографа.

2. В программе MagicIC во вкладке проведения анализа в строке «Метод» выбрать «Vse anions-6». В строке «Идентификатор» указать Фамилию и номер группы. В строке «Позиция» указать номер позиции пробирки с образцом в автосэмплере. В строке «Разбавление» указать 1. В строке «Объём вкола» указать 20 мкл. Нажать зелёную кнопку «Старт».

3. Дождаться завершения анализа.

4. После завершения анализа, открыть вкладку «Результаты» и найти хроматограмму проведённого анализа. Оценить полученные данные.

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

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

7. Рассчитать разрешение колонки.

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

Вещество	t_R	$t'R$	V_R	$V'R$	K	N	N'	R_s

Вопросы

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

2. От каких факторов зависит величина разрешения?

3. Ионная хроматография – это вариант газовой или жидкостной хроматографии?
4. Что лежит в основе ионной хроматографии?
5. Что используется в качестве сорбентов в ИХ?
6. В чем отличие катионообменника от анионообменника?
7. Что положено в основу детектирования в ИХ?
8. В чем главная особенность двухколоночной ионной хроматографии?
9. Каковы области применения, достоинства и недостатки ионной хроматографии?

Литература

1. Рабочая инструкция по проведению работ на анионном хроматографе 881 Metrohm IC pro.
2. Инструкция по охране труда при работе на анионном хроматографе 881 Metrohm IC pro.
3. Стыскин Е.Л., Ициксон Л.Б., Брауде Е.В. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. М.: Химия, 1986. 288 с.
4. Шпигун О.А., Золотов Ю.А. Ионная хроматография. М.: Изд.Моск.ун-та, 1990.
5. Фритц Дж., Гьерде Д., Поланд К. Ионная хроматография. М.: Мир, 1984.
6. Хроматографические методы анализа. Методическое пособие для специального курса. — МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 2007. — 204 с.