

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт химии
Кафедра аналитической химии

Булатов А.В., Почивалов А.С., Родинков О.В.,
Шишов А.Ю., Якимова Н.М.

Основы гибридных методов анализа

Учебное пособие

Санкт-Петербург

2023 г.

УДК 543.05; 543.06; 543.42; 543.54; 543.55
ББК 24.46

*Рекомендованы Учебно-методической комиссией Института химии СПбГУ
Одобрены на заседании кафедры аналитической химии*

Рецензенты:

доктор хим. наук, проф. А.А. Карцова (СПбГУ)
доктор хим. наук, проф. С.Ю. Гармонов (КНИТУ)

Основы гибридных методов анализа. Учебное пособие / Булатов А.В., Почивалов А.С., Родинков О.В., Шишов А.Ю., Якимова Н.М. – СПб: электронное издание, 2023 –69 с.

В настоящее время гибридные методы находят широкое применение в количественном химическом анализе проб сложного состава и при идентификации веществ. Особенно широко эти методы используются при определении органических соединений, когда затруднено применение селективных методов анализа, не требующих предварительного разделения аналитов.

В учебном пособии изложены основные сведения о наиболее распространенных гибридных методах анализа: хроматографии, хромато-масс-спектрометрии и капиллярном электрофорезе. Обсуждаются возможности и ограничения перечисленных методов, используемая аппаратура и методические подходы. Представлено описание лабораторных работ, включающих решение конкретных аналитических задач с помощью хроматографии и капиллярного электрофореза.

Учебное пособие предназначено для студентов младших курсов бакалавриата Института химии СПбГУ по ООП «Химия» и смежным направлениям.

© Булатов А.В., Почивалов А.С., Родинков О.В.,
Шишов А.Ю., Якимова Н.М. СПбГУ, 2023

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|--|----|
| Введение | 4 |
| 1. Хроматографические методы анализа | 5 |
| 2. Газовая хроматография | 9 |
| 3. Жидкостная хроматография | 17 |
| 3.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография | 18 |
| 3.2. Жидкостная хромато-масс-спектрометрия | 24 |
| 4. Ионная хроматография | 30 |
| 5. Количественный хроматографический анализ | 34 |
| 6. Капиллярный электрофорез | 38 |
| Работа 1. Определение изомеров летучих органических соединений в водных растворах методом капиллярной газожидкостной хроматографии | 42 |
| Работа 2. Определение следовых концентраций метанола в этиловом спирте методом капиллярной газожидкостной хроматографии | 47 |
| Работа 3. Определение витаминов в витаминно-минеральных комплексах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии | 52 |
| Работа 4. Определение кофеина в чае методом высокоэффективной жидкостной хроматографии | 55 |
| Работа 5. Определение анионов в водных растворах методом ионной хроматографии | 58 |
| Работа 6. Определение катионов в водном растворе методом капиллярного электрофореза | 62 |
| Список рекомендуемой литературы | 69 |

Введение

Гибридные методы анализа – это методы химического анализа, основанные на сочетании разделения компонентов анализируемой пробы и определения (детектирования) разделенных компонентов. В отличие от комбинированных методов, в которых стадии разделения и определения могут выполняться независимо друг от друга, в гибридных методах эти стадии реализуются в едином аналитическом цикле в одном аналитическом приборе. В англоязычной литературе для таких методов применяется термин «hyphenated methods», который дословно переводится как «методы, название которых пишется через дефис». К гибридным методам анализа относят капиллярный электрофорез, хроматографию, масс-спектрометрию, сочетание двух последних методов – хромато-масс-спектрометрию, а также довольно редкие ППФ-методы (поле – поток – фракционирование), в которых происходит проточное фракционирование компонентов под действием поперечного поля. Например, в гибридном методе высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрическим детектированием (ВЭЖХ-ФЛД) одновременно сочетаются возможности разделения многокомпонентных смесей (на хроматографической колонке) и высокочувствительного определения аналитов, способных к флуоресценции (с помощью флуориметрического детектора). В применяемой аббревиатуре ВЭЖХ-ФЛД методы разделения (хроматография) и детектирования (флуориметрия) указываются через дефис.

Гибридные методы обладают способностью отдельного определения веществ с близкими свойствами, например, изомеров органических соединений после их разделения. Эти методы являются высокочувствительными и экспрессными. Отмеченные достоинства гибридных методов привели к их широкому внедрению в аналитическую практику при решении задач выполнения многокомпонентного анализа и идентификации веществ. Достаточно сказать, что с помощью хроматографических методов выполняется более 50 % анализов в мире, а в случае определения органических соединений – более 80 %.

В данном учебном пособии описаны основные принципы методов газовой и жидкостной хроматографии, хромато-масс-спектрометрии и капиллярного электрофореза. Аналитические возможности перечисленных методов обсуждаются в соответствующих разделах.

1. Хроматографические методы анализа

Хроматографические методы анализа являются важнейшей разновидностью гибридных методов. Они представляют собой сочетание хроматографических методов разделения и методов определения аналитов в потоке подвижной фазы. Разделение в хроматографических методах основано на различиях в распределении компонентов пробы между подвижной и неподвижной фазами. Неподвижная фаза представляет собой пористое вещество с развитой поверхностью или плёнку жидкости, нанесённую на поверхность твёрдого инертного носителя или внутренние стенки капилляра.

В зависимости от агрегатного состояния подвижной фазы хроматографические методы анализа разделяют на газовую, жидкостную и сверхкритическую флюидную хроматографию. Газовая хроматография – один из наиболее распространенных аналитических методов, применяемых для определения летучих органических и неорганических соединений, обладающих термостабильностью, т.е. устойчивостью к разложению при повышенных температурах в среде инертного газа-носителя, выполняющего функцию подвижной фазы. Как правило, верхняя граница диапазона рабочих температур для большинства современных газовых хроматографов составляет 450 °С, хотя есть специализированные хроматографы, работающие при более высоких температурах. Кроме того, газохроматографическое разделение возможно и при пониженных температурах, например, при температуре жидкого азота (- 196 °С).

Для определения соединений, которые не обладают достаточной летучестью и термостабильностью, применяются методы жидкостной хроматографии. Эти методы позволяют определять широкий спектр органических веществ, а также ионы неорганических и органических соединений. В методах жидкостной хроматографии элюент в отличие от газовой хроматографии выполняет не только транспортную функцию, способствуя перемещению разделяемых веществ через хроматографическую колонку с сорбентом, но и обеспечивает межмолекулярные взаимодействия со стационарной фазой и разделяемыми веществами, которые влияют на селективность разделения. Изменение природы элюента приводит к изменению параметров удерживания целевых аналитов, поэтому основным приемом «управления» процессом разделения веществ в жидкостной хроматографии является варьирование состава подвижной фазы.

В сверхкритической флюидной хроматографии подвижной фазой служит вещество, находящееся в сверхкритическом состоянии, то есть при температуре и давлении выше критических. Благодаря низкой вязкости сверхкритических флюидов по сравнению с жидкостями и относительно высокими коэффициентами диффузии в этом методе могут

реализовываться высокие скорости потоков, а, следовательно, большая экспрессность анализа. При этом эффективность разделения будет выше, чем в случае жидкостной хроматографии. Однако необходимость в обеспечении высоких температур и давления в процессе хроматографического разделения является существенным ограничением метода.

В хроматографических методах анализа кривую, отражающую изменение во времени концентрации компонентов в потоке подвижной фазы на выходе из хроматографической колонки, называют хроматограммой. Типичная хроматограмма, соответствующая наиболее распространенному элюентному варианту хроматографического разделения (веществ А и В), приведена на рис. 1. На хроматограмме аналитический сигнал функционально связан с концентрацией разделяемых компонентов.

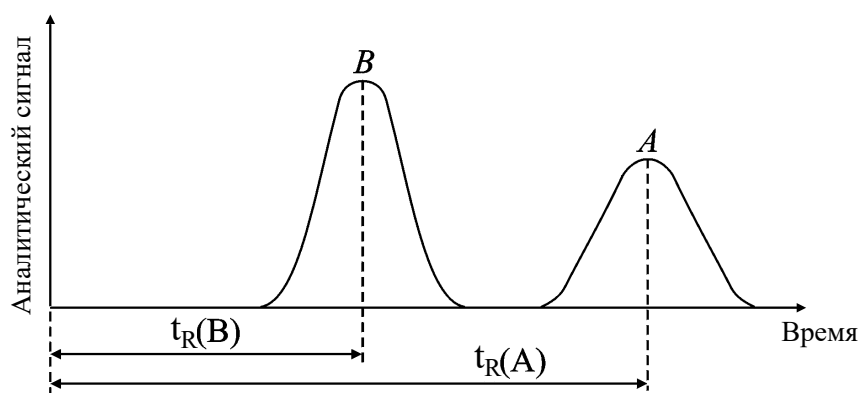


Рисунок 1. Вид хроматограммы при элюентном хроматографическом разделении.

Рассмотрим основные параметры, характеризующие поведение вещества в хроматографической колонке. Время с момента ввода анализируемой пробы до момента регистрации максимума хроматографического пика на хроматограмме называют временем удерживания (retention time) 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):

$$t_R = t_m + t_s$$

Значение t_m («мёртвое время») фактически равно времени прохождения через колонку неудерживаемого компонента.

При невысоких концентрациях аналитов значение t_R не зависит от количества пробы, вводимой в колонку, но зависит от природы вещества и неподвижной фазы, а также от объема последней и может меняться от колонки к колонке. Параметр t_R служит для идентификации аналитов.

Для сопоставления хроматографических данных, полученных в различных условиях или в разных лабораториях, на практике используют приведённое время удерживания (t'_R):

$$t'_R = t_R - t_m$$

Высота (h) или площадь (S) пика зависят от количества вещества и являются количественными характеристиками:

$$S = hw_{0,5},$$

где $w_{0,5}$ – полуширина пика, равная промежутку между ветвями пика на половине высоты.

Разделение двух соседних пиков характеризуется степенью разделения (разрешение) (R_s). Правильность определения зависит от того, насколько хорошо пики отделены друг от друга и насколько велико значение R_s . Пики не должны сильно перекрываться, и в то же время расстояние между ними не должно быть очень большим, так как это неоправданно замедляет анализ и увеличивает расход подвижной фазы. Степень разделения рассчитывают по параметрам хроматографических пиков, используя выражение:

$$R_s = 2(t_{R1} - t_{R2}) / (w_{0,5(1)} + w_{0,5(2)})$$

На рис. 2 приведены пики веществ А и В при разном разрешении:

- при $R_s=0,50$ (рисунок 2а) разделение практически не произошло;
- при $R_s=1,00$ (рисунок 2б) произошло частичное разделение;
- при $R_s=1,50$ (рисунок 2в) можно считать, что оба вещества разделены полностью.

Значение $R_s=1,50$ является оптимальным только для симметричных пиков. Если пики асимметричны (имеют «хвосты»), то оптимальное значение R_s будет больше.

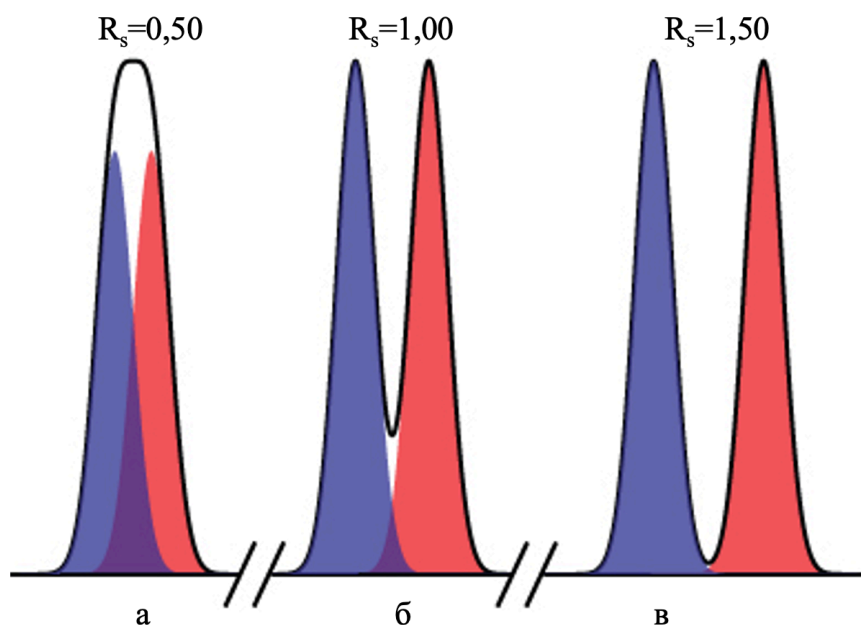


Рисунок 2. Разделение хроматографических пиков.

На основании экспериментально полученной хроматограммы можно оценить эффективность хроматографической колонки. Для этого используют основные представления так называемой тарелочной теории хроматографии. Число формальных актов межфазного распределения веществ при осуществлении хроматографического процесса характеризуется числом эквивалентных теоретических тарелок (N). Чем больше N , тем эффективнее хроматографическая колонка и тем выше её разделительная способность. Протяженность массообменного слоя, в пределах которого устанавливается формальное межфазное равновесие при осуществлении хроматографического процесса, соответствует высоте, эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ), и служит показателем эффективности хроматографического процесса. Чем меньше значение ВЭТТ, тем большее число эквивалентных теоретических тарелок отвечает одной и той же длине массообменного слоя и тем выше эффективность хроматографического процесса.

Число теоретических тарелок и ВЭТТ связаны соотношением: $N = L/N$, где L – длина колонки. Из экспериментальных данных (хроматограмма) рассчитывают N по формуле:

$$N = 5,55(t_R/w_{0,5})^2$$

При этом значения времени удерживания (t_R) и полуширины пика ($w_{0,5}$) должны быть выражены в одних единицах.

2. Газовая хроматография

Неподвижной фазой в газовой хроматографии служит либо твердый сорбент (*газоадсорбционная хроматография*), либо пленка жидкости, нанесенная на твердофазный носитель или внутреннюю стенку капилляра (*газожидкостная хроматография*). неподвижная фаза находится в стеклянной или металлической трубке/капилляре, называемой хроматографической колонкой. анализируемая смесь переводится в газообразное состояние и потоком инертного газа-носителя направляется в хроматографическую колонку, где происходит разделение компонентов.

Устройство газового хроматографа

Газовый хроматограф состоит из устройства для регулирования потока газа-носителя, порта для ввода пробы, хроматографической колонки, термостата колонок и детектора, подключенного к компьютеру (рис. 3). проба, вводимая в порт ввода пробы, испаряется и попадает в хроматографическую колонку с потоком газа-носителя. За счет различных коэффициентов распределения аналитов между неподвижной и подвижной фазами зоны аналитов с различной скоростью перемещаются по хроматографической колонке, в результате чего происходит их разделение. Разделенные зоны регистрируются проточным детектором в виде хроматографических пиков.

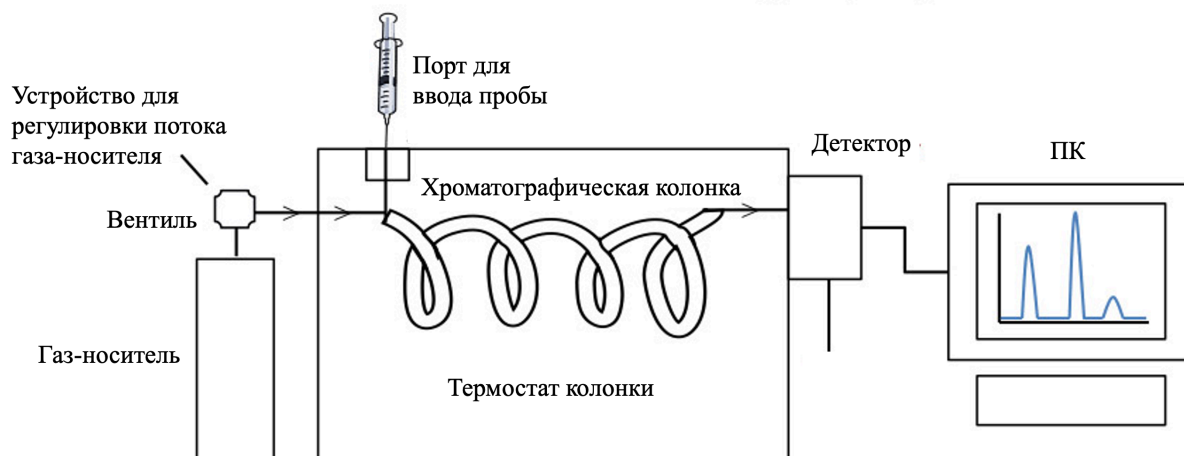


Рисунок 3. Блок-схема газового хроматографа.

Газ-носитель

Газ-носитель должен быть инертным и не взаимодействовать с разделяемыми аналитами. Кроме того, он должен обладать определенными физико-химическими свойствами для функционирования используемого детектора. Распространенными газами-

носителями являются He, N₂, H₂ и Ar. От чистоты газа-носителя зависит чувствительность газохроматографического анализа. Обычно используют газы с чистотой 99,995 % и выше.

Система ввода пробы

Большинство современных хроматографов позволяют вводить как жидкие, так и газообразные пробы, а также анализировать твердофазные пробы. Для дозирования газообразных смесей используют краны-дозаторы, позволяющие вводить в хроматографическую колонку определенный объем газообразной пробы. Конструкция кранов-дозаторов предусматривает использование сменных дозирующих петель объемом от 0,01 до 10 мл. Также газовые пробы можно вводить шприцем непосредственно в испаритель (инжектор).

Жидкие пробы перед попаданием в хроматографическую колонку должны быть переведены в газовую фазу. Испарение жидкой пробы происходит в испарителе (инжекторе). Испаритель представляет собой нагреваемый до определенной температуры металлический блок с каналом для ввода и испарения жидкой пробы. В канал подается поток газа-носителя. С одной стороны канал закрыт прокладкой из термостойкой силиконовой резины, а с другой – к нему присоединена хроматографическая колонка. Введение жидких смесей выполняют специальными микрошприцами. Иглу микрошприца с анализируемой жидкостью вводят через прокладку в канал испарителя, введенная проба быстро испаряется и переносится потоком газа-носителя в колонку. Существуют различные микрошприцы, позволяющие дозировать пробы объемом от 0,1 до нескольких микролитров.

Обычно используют микрошприцы с максимальным дозируемым объемом 1 или 10 мкл, которые различаются по своей конструкции. В микрошприцах вместимостью 10 мкл в качестве поршня используется калиброванная проволока из нержавеющей стали. Поршень и цилиндр взаимно притерты и не требуют смазки. В этих шприцах часть пробы может находиться в игле, а другая часть – в калиброванном стеклянном цилиндре. В микрошприцах вместимостью 1 мкл весь дозируемый объем заключен в самой игле. Плунжер в виде стальной проволоки передвигается в игле. С помощью таких микрошприцев можно вводить пробы от 0,1 до 1 мкл.

В зависимости от ситуации жидкие пробы вводят в хроматограф без деления (splitless) или с делением потока газа-носителя (split). В последнем случае определенная доля пробы и потока газа-носителя через электронный регулятор направляется на сброс. Ввод проб с делением потока обеспечивает лучшее разрешение аналитов, в то время как ввод проб без деления потока (splitless) лучше всего подходит для определения следовых

количеств веществ (концентрация менее 0,01 %), однако требует применения программирования температуры при проведении анализа.

Техника дозирования с делением и без деления потока различны. В последнем случае жидкую пробу вводят медленно (в течение 5-10 с) с помощью микрошприца на 10 мкл через «горячую» иглу, предварительно нагретую в течение нескольких секунд в испарителе хроматографа. При этом игла должна быть пустой, а вся проба должна находиться в цилиндре микрошприца. Тот же прием с незаполненной пробой иглой используют и при дозировании пробы с делением потока, однако при этом иглу предварительно не нагревают в испарителе, а дозирование проводят быстро (в течение не более 0,5 с) и мгновенно вынимают иглу из испарителя после дозирования. В обоих случаях перед дозированием рекомендуется протереть иглу микрошприца фильтровальной бумагой для удаления остатков пробы, которые могут находиться в микротрещинах иглы. Кроме того, для избежания поломки довольно дорогого микрошприца в момент прокалывания прокладки испарителя иглой микрошприца его следует держать правой рукой, а пальцами левой руки следует придерживать иглу микрошприца, не позволяя ей погнуться.

При анализе твердофазных проб они помещаются в специальное устройство, где нагреваются с выделением летучих веществ в газовую фазу с последующим ее вводом в хроматограф.

Колонки

Основная задача хроматографической колонки состоит в том, чтобы разделить многокомпонентную анализируемую смесь на индивидуальные компоненты. Селективность в газовой хроматографии зависит от выбора стационарной фазы. Порядок элюирования в газожидкостной хроматографии определяется в первую очередь температурой кипения аналита. Аналиты со значительно различающимися температурами кипения легко разделяются. Аналиты с одинаковыми температурами кипения могут быть разделены только в том случае, если неподвижная фаза сильнее взаимодействует с одним из аналитов. Основными критериями выбора стационарной фазы являются инертность, термическая стабильность, низкая летучесть и соответствующая полярность для разделения аналитов.

Хроматографические колонки бывают двух основных типов – насадочные и капиллярные. Сравнение характеристик насадочных и капиллярных колонок представлено в табл. 1.

Насадочные колонки изготавливают из металлических, стеклянных или фторопластовых трубок. Насадочные колонки заполняют адсорбентом или порошком

инертного твердого носителя, на поверхность которого наносится жидкая неподвижная фаза.

Таблица 1. Сравнение характеристик насадочных и капиллярных колонок.

| Параметр | Насадочная колонка | Капиллярная колонка |
|------------------------------|--------------------|---------------------|
| Длина, м | 1-6 | 10-100 |
| Внутренний диаметр, мм | 2-4 | 0,10-0,53 |
| Число теоретических тарелок | до 6000 | до 1000000 |
| Расход газа-носителя, мл/мин | 10-100 | 0,3-5,0 |

Как правило, капиллярные колонки изготавливают из плавленного кварца. Для создания механической прочности внешнюю поверхность капиллярной колонки покрывают полиимидным лаком. В газожидкостном варианте хроматографии внутреннюю поверхность капиллярной колонки покрывают тонкой пленкой неподвижной фазы. Такие колонки называют WCOT-колонки (wall-coated open tubular column). В газоадсорбционной хроматографии на внутреннюю поверхность капиллярной колонки наносят слой мелкодисперсного адсорбента. Такие колонки называют PLOT-колонки (porous-layer open tubular column). Капиллярные колонки с неподвижной фазой, нанесенной на слой носителя, закрепленного на внутренней поверхности капилляра, называют SCOT-колонки (support-coated open tubular column). Последние колонки практически не используются, поскольку их характеристики трудно воспроизводятся при серийном изготовлении. Жидкая неподвижная фаза представляет собой нелетучую, высококипящую, с низкой вязкостью жидкость различной полярности и химической природы – углеводороды (индивидуальные или смеси) с числом углеродных атомов в цепи от 16 до 30, полисилоксаны (силиконы), полигликоли (например, полиэтиленгликоль, полиэтиленгликольадипинат), полиэфиры, амиды, амины, жирные кислоты и др. Масса жидкой неподвижной фазы обычно составляет от 1 до 20 % от массы твердого носителя (чаще всего от 3 до 10 %). Неподвижная фаза наносится на поверхность твердого носителя из раствора в соответствующем летучем растворителе при последующем его упаривании.

Детекторы

Хроматографический детектор представляет собой устройство, предназначенное для обнаружения и количественного определения выходящих из колонки в потоке подвижной фазы компонентов анализируемой смеси. Регистрация вещества осуществляется за счет преобразования в электрический сигнал изменений химических или физико-химических свойств потока, выходящего из хроматографической колонки.

Основные требования, предъявляемые к хроматографическим детекторам:

- Детектор должен обладать высокой чувствительностью и регистрировать даже малые изменения физико-химических свойств подвижной фазы;
- Величина сигнала детектора должна изменяться пропорционально изменению концентрации определяемого компонента в подвижной фазе;
- Детектор должен регистрировать определяемые компоненты по возможности мгновенно (иметь достаточное быстродействие);
- Рабочий объем детектора должен быть по возможности наименьшим, чтобы минимизировать размывание пиков в детекторе.

Наибольшее распространение в силу универсальности, превосходных характеристик и высоких эксплуатационных качеств получили пламенно-ионизационный детектор (ПИД) и детектор по теплопроводности (ДТП). Кроме того, широко используются селективные детекторы, позволяющие определять в сложных смесях только соединения определенного состава. К ним в первую очередь относятся электрозахватный (ЭЗД), пламенно-фотометрический (ПФД), фотоионизационный (ФИД) и масс-селективным (МС) детекторы, использование которых упрощает идентификацию компонентов, повышает чувствительность, значительно сокращает время анализа и объем пробы исследуемой смеси. Такие преимущества селективных детекторов являются основной причиной их широкого применения при анализе сложных смесей биологического или природного происхождения. Ниже представлена информация об основных детекторах, применяемых в газовой хроматографии.

Пламенно-ионизационный детектор

ПИД является универсальным детектором, обладает высокой чувствительностью к органическим соединениям, имеет широкий линейный диапазон и сравнительно малую зависимость рабочих параметров от конструкции и внешних условий. Принцип действия ПИД основан на ионизации молекул определяемых органических соединений в водородном пламени и измерении ионного тока. Сигнал детектора прямо пропорционален количеству определяемого вещества, поступающего в него в единицу времени.

Для работы детектора необходимо использовать дополнительные газы: воздух и водород. Они поддерживают горение пламени в детекторе. Устойчивость работы и максимальная чувствительность ПИД обеспечиваются правильным выбором расходов газа-носителя, водорода и воздуха. Оптимальные расходы газов и их соотношения несколько зависят от конструкции детекторов, однако для большинства конструкций наибольшая чувствительность и стабильность работы достигаются при соотношении расходов газа-носителя, водорода и воздуха близком к 1:1:10.

Поскольку в пламени чистого водорода число ионов мало, сопротивление газового пространства очень велико и ток детектора весьма мал. Этот ток, возникающий за счет ионизации примесей, содержащихся в газе-носителе, водороде и воздухе, является постоянным фоновым током детектора. При внесении с газом-носителем из колонки определяемых органических веществ число ионов в пламени резко увеличивается, сопротивление пламени падает и в детекторе регистрируется соответствующее возрастание ионного тока. Очень слабая реакция ПИД на воду и отсутствие чувствительности к неорганическим соединениям, инертным газам и водороду делают его незаменимым при определении примесей органических веществ в воздухе, сточных и природных водах, а также в биологических объектах. Сравнительно слабая зависимость чувствительности детектора от изменения расходов газов и температуры и строгая пропорциональность сигнала детектора количеству вещества в широких пределах создали ПИД репутацию лучшего детектора эконом-класса для определения различных органических веществ.

Детектор по теплопроводности

ДТП является универсальным детектором. Принцип действия ДТП основан на изменении температуры нагретых нитей (чувствительных элементов) в зависимости от теплопроводности газа, которая в свою очередь определяется его составом. ДТП измеряет различие в теплопроводности чистого газа-носителя и смеси газа-носителя с веществом, выходящим из хроматографической колонки, поэтому наибольшая чувствительность может быть получена в том случае, когда теплопроводность определяемого вещества сильно отличается от теплопроводности газа-носителя. Большинство веществ в газообразном состоянии имеют относительно низкую теплопроводность и для их определения целесообразно использовать газы-носители с возможно более высокой теплопроводностью, например, гелий или водород.

Электронно-захватный детектор

ЭЗД является селективным детектором. ЭЗД применяется для определения галоген-, кислород- и азотсодержащих веществ, некоторых металлоорганических соединений и других веществ, содержащих атомы с явно выраженным сродством к электрону.

Для устойчивой работы детектора необходимо прежде всего обеспечить постоянную скорость образования свободных электронов в ионизационной камере, что достигается помещением в нее радиоактивного источника. В качестве газа-носителя используется азот, способный ионизироваться под действием бета излучения радиации с освобождением электрона. При появлении в детекторе молекул определяемых веществ, обладающих высоким сродством к электрону, происходит захват ими свободных

электронов. В результате этого процесса общее число заряженных частиц в ионизационной камере уменьшается, что приводит к снижению фонового тока детектора. Таким образом, сигналом детектора является уменьшение начального тока, связанное с количеством анализируемого компонента. Чувствительность детектора зависит от природы определяемых веществ, вида и числа атомов, обладающих сродством к электрону, структуры веществ. Чувствительность ЭЗД возрастает с увеличением числа атомов галогенов в молекуле, а также в ряду фтор-, хлор-, бром- и йодсодержащих соединений.

Пламенно-фотометрический детектор

ПФД является селективным детектором. Принцип действия ПФД основан на измерении интенсивности электромагнитного излучения, возникающего при переходе из возбужденного в основное состояния атомов фосфора и серы в водородном пламени. Следует отметить, что этот детектор правильнее было бы назвать пламенно-эмиссионным, поскольку регистрируется излучение, а не поглощение света. Различие условий сжигания водорода в ПФД и ПИД состоит в том, что в ПФД пламя обогащено водородом, в то время как в ПИД оно обогащено кислородом. Чувствительность ПФД к серо- или фосфорсодержащим веществам тем больше, чем выше содержание этих элементов в молекуле аналита. Сигнал фосфорорганических соединений пропорционален их концентрации в потоке газа-носителя, а сигнал серосодержащих веществ пропорционален логарифму потока вещества. Характерной особенностью ПФД является его высокая селективность по отношению к азот- и фосфор содержащим соединениям на фоне углеводов. Так, наличие в пламени углеводов, выходящих из колонки одновременно с серо- и фосфорсодержащими веществами, может понизить или полностью подавить пики этих веществ, хотя эмиссия от углеводов сама по себе не детектируется.

Фотоионизационный детектор

Принцип действия ФИД заключается в ионизации молекул определяемых веществ под действием УФ-излучения и измерении возникающего ионного тока. Чувствительность ФИД зависит от химического строения молекулы: числа атомов углерода, природы и положения функциональных групп, двойных и сопряженных двойных связей. Так, чувствительность ФИД уменьшается в следующем ряду соединений: арены > алкены > алканы и кетоны > альдегиды > эфиры > спирты. Сигнал ФИД пропорционален концентрации аналита и зависит от интенсивности УФ-излучения.

Масс-селективный детектор

Масс-спектрометрия является идеальным дополнением к газовому хроматографу, позволяя получить масс-спектр каждого компонента, разделенного в газовом хроматографе. Сущность масс-спектрометрического метода измерения состоит в следующем: в устройстве, которое называется ионным источником, исследуемое вещество подвергается ионизации. При этом образуются группы характеристических ионов, имеющих различные массы, которые направляются в масс-анализатор – устройство, где происходит пространственное или временное разделение ионов по массе (точнее по отношению массы к заряду или m/z). Разделенные ионы поступают в детектор, регистрирующий зависимость интенсивности ионного тока от отношения массы к заряду, которая и представляет собой масс-спектр. Таким образом, масс-спектр является набором пиков. Положение пика в масс-спектре определяет отношение массы к заряду зарегистрированного иона, а его интенсивность – относительное количество ионов данного типа.

Условия эффективного разделения в газовой хроматографии

Основным параметром, обеспечивающим эффективное разделение в хроматографических методах, является ВЭТТ. В газовой хроматографии основное влияние на ВЭТТ оказывает скорость газа-носителя. Влияние средней линейной скорости газа-носителя (u) на ВЭТТ (H) описывается уравнением Ван-Деемтера:

$$H = A + B/u + C \cdot u$$

Константа A в уравнении Ван-Деемтера учитывает неравномерность движения потока газа-носителя и называется вихредиффузионным членом. Для снижения этого фактора необходимо заполнять колонку, по возможности, частицами сорбента с малыми и одинаковыми размерами. Член A равен нулю для капиллярных колонок, которые имеют открытое поперечное сечение.

Константа B учитывает расширение зоны, вызванное продольной диффузией разделяемых молекул в потоке газа-носителя. В соответствии с физическим смыслом второго члена уравнения Ван-Деемтера для уменьшения H следует использовать высокую скорость газа-носителя, уменьшая время пребывания молекул аналита в хроматографической колонке.

Константа C учитывает сопротивление массопереносу в колонке, препятствующее мгновенному установлению равновесия в распределении молекул аналита между газом-носителем и неподвижной фазой. В соответствии с физическим смыслом третьего члена уравнения Ван-Деемтера для уменьшения величины H необходимо уменьшать скорость

потока газа-носителя. Основным средством снижения третьего члена является уменьшение размеров частиц сорбента в насадочной колонке или толщины пленки стационарной фазы в капиллярной колонке.

На рис. 4 показано влияние средней линейной скорости газа-носителя на ВЭТТ. При минимальном значении ВЭТТ ($H_{\text{мин}}$), колонка имеет максимальную эффективность. Она достигается при оптимальной скорости $u_{\text{опт}}$. На практике, однако, работают со скоростями, превышающими $u_{\text{опт}}$, чтобы сократить время анализа. При этих условиях эффективность колонки определяется членом C уравнения Ван-Деемтера. С помощью уравнения Ван-Деемтера можно выявить условия, позволяющие свести к минимуму размывание зон и, следовательно, достичь максимального разрешения.

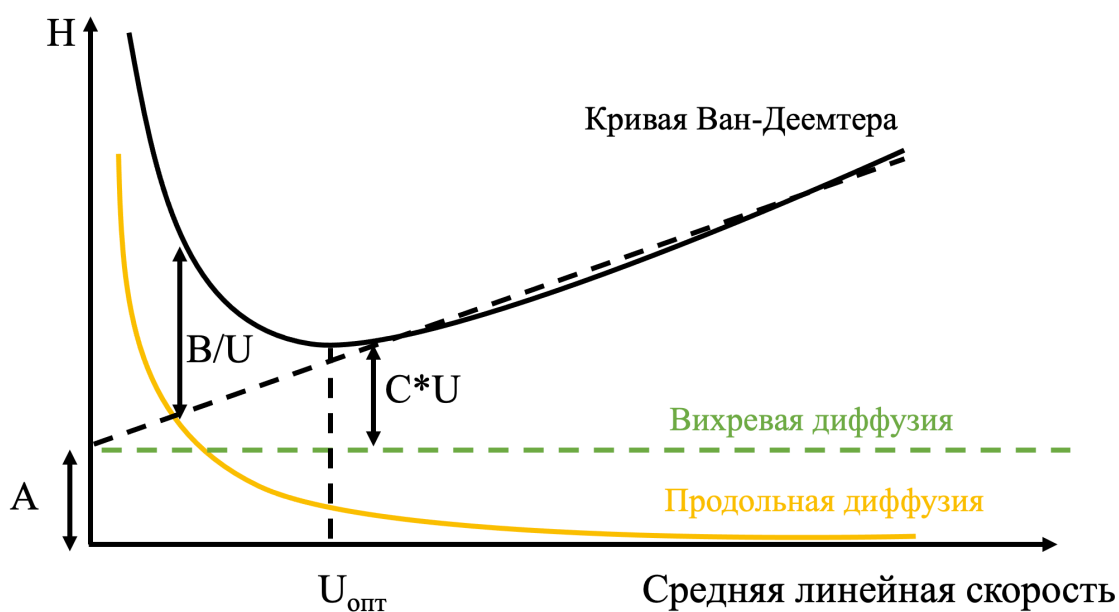


Рисунок 4. Типичная форма кривой Ван-Деемтера.

3. Жидкостная хроматография

Жидкостная хроматография – это хроматографический метод разделения и анализа сложных смесей веществ, в котором подвижной фазой служит жидкость. Этот метод применяют для разделения более широкого круга веществ, чем в методе газовой хроматографии, поскольку не все вещества обладают достаточной летучестью, а некоторые из них могут разлагаться при высоких температурах. В жидкостной хроматографии применяя различные подвижные фазы можно изменять параметры удерживания и селективность хроматографической системы. Возможно также

использование градиентного элюирования, основанного на изменении состава подвижной жидкой фазы.

Методы жидкостной хроматографии классифицируют по механизму удерживания веществ стационарной фазой и выделяют:

жидкостно-адсорбционную – разделение веществ происходит за счёт их различной адсорбции на поверхности адсорбента;

жидкостно-жидкостную или распределительную – разделение осуществляется за счёт различных коэффициентов распределения между подвижной фазой и неподвижной жидкой фазой, удерживаемой на носителе;

ионообменную – разделение достигается за счёт различий в константах ионного обмена разделяемых ионов;

эксклюзионную или гель-хроматографию – разделение основано на различиях в соотношении размеров разделяемых молекул и пор геля (стационарной фазы);

аффинную жидкостную хроматографию – основана на образовании специфичной и обратимой связи со специфическими группами стационарной фазы.

В случае жидкостно-адсорбционной хроматографии в зависимости от полярности сорбента (стационарной фазы) и элюента (подвижной фазы) реализуют два варианта выполнения процедуры разделения веществ: *нормально-фазовый* вариант (полярный адсорбент и неполярная подвижная фаза) либо *обращенно-фазовый* вариант (неполярный адсорбент и полярная подвижная фаза).

3.1 Высокоэффективная жидкостная хроматография

Появление доступных насосов высокого давления способствовало разработке высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В этом методе используют сорбенты с размером частиц менее 10 мкм, а с целью большей эффективности разделения компонентов смеси увеличивают плотность набивки хроматографических колонок.

Общая схема системы ВЭЖХ представлена на рис. 5. Система ВЭЖХ обычно включает узел подготовки элюента с системой дегазации; насосную систему; смеситель подвижной фазы; блок ввода пробы (инжектор); хроматографическую колонку (обычно термостатируемую); детектор и систему сбора и обработки данных.

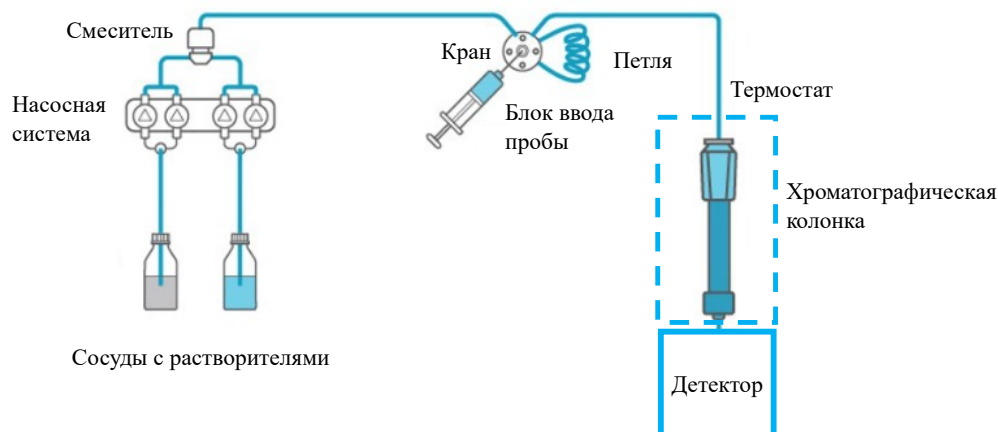


Рисунок 5. Общая схема системы ВЭЖХ.

Насосная система

Насосная система необходима для поддержания контролируемой скорости подачи подвижной фазы. Обычно насосная система создает высокое давление (обычно от 5 до 20 МПа) для того, чтобы подвижную фазу можно было прокачать через хроматографическую колонку с необходимой скоростью, поскольку мелкие частицы сорбента, которыми заполнена колонка, создают высокое сопротивление потоку. Насосы высокого давления должны обеспечивать с высокой точностью постоянный и равномерный поток, с целью обеспечения постоянного времени удержания компонентов смеси. Для аналитической работы со стандартными колонками (внутренний диаметр 4,6 мм) используемая скорость потока находится в пределах от 0,1 до 1 мл/мин. Часто выбирают стандартную скорость 1 мл/мин. Пульсации прокачиваемого насосом потока очень часто выравнивают демпферами (например, мембранным). Насосные системы, используемые в ВЭЖХ, могут оснащаться дегазаторами. Насосная система обеспечивает точную подачу подвижной фазы постоянного (изократическое элюирование) или переменного (градиентное элюирование) состава в соответствии с определенной программой. Градиентное элюирование позволяет достигнуть разрешения пиков при минимальном времени анализа. При выборе градиентного элюирования следует состав подвижной фазы сохранять одинаковым в начале и конце градиента (например, 20 % органического растворителя), а наклон градиента можно делать разным.

Блок ввода проб (инжектор)

Блок ввода пробы должен обеспечивать воспроизводимую подачу в колонку точно определенного объема раствора пробы без прерывания потока элюента. Для ввода пробы используют петлевые дозаторы фиксированного объема (например, 20 мкл) или устройства с регулируемым объемом, которыми можно управлять вручную или

автоматически. Для ввода пробы через петлю в колонку используют шестиходовой кран-переключатель, который обладает двумя положениями: LOAD (заполнение петли) и INJECT (ввод пробы). В положении LOAD с помощью шприца пробу вводят в петлю, промывая 3-5 кратным избытком объема пробы для удаления из петли остатков элюента. В это время элюент продолжает поступать от насоса через кран в колонку, минуя петлю при постоянном рабочем давлении. При переводе крана в положение INJECT элюент направляется через петлю и переносит пробу в колонку.

Хроматографическая колонка

Хроматографические колонки обычно представляют собой трубки из нержавеющей стали, заполненные сорбентом и закрытые с обеих сторон пористыми фильтрами с диаметром пор 0,5-1,0 мкм. Длина колонки может находиться в диапазоне от 5 до 60 см, внутренний диаметр – от 2 до 10 мм. Перед хроматографической колонкой обычно устанавливают короткую колонку (предколонку), заполненную тем же сорбентом, основная функция которой – защита хроматографической колонки от загрязнений.

Неподвижная фаза

В нормально-фазовой ВЭЖХ используют полярные сорбенты, например, силикагели. На поверхности силикагеля находятся свободные силанольные группы, которые вступают с разделяемыми веществами в диполь-дипольные и другие взаимодействия. Для элюирования анализов используют неполярную подвижную фазу. Нормально-фазовая ВЭЖХ применяется для разделения неполярных и умеренно полярных веществ, растворимых в неполярных органических растворителях. Полярные органические соединения могут необратимо удерживаться на силикагелях.

В обращенно-фазовой ВЭЖХ применяют неполярную стационарную фазу и полярную подвижную фазу. В этом случае используют силикагели с привитыми гидрофобными функциональными группами. Природа привитой фазы является важной характеристикой, определяющей разделяющие свойства хроматографической колонки. При этом остаточные силанольные группы могут быть причиной размывания заднего фронта пика, особенно для веществ основного характера. Ниже представлены наиболее часто используемые функциональные группы:

Октильная $-\text{Si}-[\text{CH}_2]_7-\text{CH}_3$

Октадецильная $-\text{Si}-[\text{CH}_2]_{17}-\text{CH}_3$

Фенильная $-\text{Si}-[\text{CH}_2]_n-\text{C}_6\text{H}_5$

В обращенно-фазовой ВЭЖХ неполярные молекулы сильно удерживаются на неполярной стационарной фазе и медленно с нее элюируются. Полярные вещества ввиду

слабого удерживания на стационарной фазе элюируются быстрее чем неполярные вещества.

Размер частиц для большинства используемых неподвижных фаз составляет от 2 мкм до 10 мкм. Частицы могут иметь сферическую или неправильную форму, различную пористость и удельную площадь поверхности. На разделение веществ влияет температура. Температура подвижной фазы и колонки в течение анализа должна быть постоянной. Большинство анализов проводится при комнатной температуре, но для обеспечения оптимального функционирования колонки может потребоваться использование других температур. Обычно колонки помещают в термостатируемый блок.

Подвижная фаза

В нормально-фазовой ВЭЖХ обычно используют малополярные органические растворители (гексан, циклогексан, гептан и др.) с небольшими добавками полярных органических соединений, которые регулируют элюирующую силу подвижной фазы. Для получения воспроизводимых результатов в нормально-фазовой ВЭЖХ необходимо строго контролировать содержание воды в растворителях, используемых в подвижной фазе. Это связано с тем, что вода адсорбируется на поверхности силикагеля и дезактивирует силанольные группы, вследствие чего удерживание компонентов уменьшается. Зачастую для получения воспроизводимых результатов перед анализом выполняют кондиционирование колонки – через нее предварительно пропускают подвижную фазу.

В обращенно-фазовой хроматографии используют водные подвижные фазы, содержащие полярные органические растворители (ацетонитрил и/или метанол). Для оптимизации разделения могут использоваться водные растворы с определенным значением рН, в частности буферные растворы, кислоты (фосфорная и уксусная кислоты при разделении соединений кислотного характера) или основания (аммиак и алифатические амины при разделении соединений основного характера). На практике рН корректируют, используя только водный компонент подвижной фазы. Компоненты подвижной фазы обычно предварительно фильтруют через мембранные фильтры для удаления механических загрязнений. Растворители в систему можно подавать с помощью индивидуальных насосов, снабженных дозирующими клапанами, которые обеспечивают смешивание растворителей в необходимых пропорциях. Также растворители можно предварительно смешивать в определенных пропорциях и подавать приготовленную подвижную фазу. Для избежания образования пузырьков газа и попадания их в ячейку детектора растворители обычно дегазируют путем пропускания через них гелия, обработкой ультразвуком и/или использованием мембранно-вакуумных модулей, работающих в режиме «on-line». Растворители и вещества, используемые для

приготовления подвижных фаз, не должны оказывать мешающее влияние на детектирование целевых аналитов. При использовании буферных или солевых растворов для предотвращения кристаллизации солей в колонке систему ВЭЖХ после выполнения анализа промывают смесью воды и небольшого количества органической части подвижной фазы (например, 5 %).

Детекторы

В качестве детекторов в ВЭЖХ наиболее часто используют спектрофотометры, работающие в ультрафиолетовой/видимой областях спектра. Применяются также многоволновые детекторы, позволяющие проводить детектирование при нескольких длинах волн одновременно, и диодно-матричные детекторы, которые позволяют регистрировать оптическую плотность одновременно в УФ и видимой областях спектра. Флуоресцентный детектор применяется для определения флуоресцирующих соединений. Для определения соединений, слабо поглощающих в ультрафиолетовой и видимой областях спектра (например, углеводов), используют рефрактометрические детекторы (рефрактометры). Электрохимические детекторы (амперометрический, кондуктометрический) используют для электрохимически активных соединений. Кроме того, используют светорассеивающие детекторы, детекторы заряженных аэрозолей, масс-селективные детекторы, обладающие высокой чувствительностью и селективностью, Фурье-ИК-детекторы, детекторы радиоактивности и другие.

Спектрофотометрические детекторы являются универсальными для веществ, поглощающих свет в УФ- или видимой области спектра (длины волн 190-600 нм). В спектрофотометрических детекторах монохроматический пучок света (т.е. излучение с определенной длиной волны) проходит через рабочую и сравнительную камеры детектора. При прохождении света через рабочую камеру он поглощается компонентами анализируемой пробы. Чем больше концентрация компонента в потоке подвижной фазы, тем больше падение интенсивности излучения, которое будет зарегистрировано фотоприемником. В спектрофотометрических детекторах источником света служит дейтериевая лампа (УФ-область спектра) или вольфрамовая лампа накаливания (видимая область спектра). Необходимую спектральную полосу выделяют с помощью дифракционных решеток или интерференционных фильтров с заданной шириной спектральной полосы.

Кроме того, широко используются диодно-матричные детекторы. Каждый диод (а их более 2000) в матрице предназначен для измерения узкой полосы (50 мкм) спектра. Детектор позволяет определять спектр каждого пика и вычислить максимальное поглощение.

Принцип действия флуориметрического детектора основан на измерении флуоресцентного излучения поглощенного света. Поглощение обычно проводят в УФ-области спектра при длине волны максимального поглощения для данной группы веществ, а излучение измеряют на выходе фильтра, не пропускающего лучи возбуждения. Длины волн флуоресцентного излучения всегда превышают длины волн поглощенного света. В связи с тем, что детектирование ведется от нулевой интенсивности флуоресценции, данный тип детектора более чувствителен по сравнению с детекторами поглощения. В тех случаях, когда аналиты не флуоресцируют, можно до или после разделения компонентов на колонке получить соответствующие производные (провести дериватизацию).

Работа электрохимических детекторов основана на определении электрохимических свойств соединений в потоке элюента. Большинство электрохимических детекторов работают в режиме, при котором поддерживается постоянное напряжение между двумя электродами, погруженными в поток элюента, и регистрируется зависимость силы тока от времени. Различают детекторы, которые реагируют либо на изменение свойств элюата, либо на конкретный компонент элюата. К первому типу относится кондуктометрический детектор, принцип работы которого основан на измерении электропроводности элюата в зависимости от содержания в нем заряженных частиц. Ко второму типу относится амперометрический детектор, действие которого заключается в измерении электрического тока в ячейке, возникающего при окислении (восстановлении) регистрируемого вещества на поверхности рабочего электрода при подаче на него определенного напряжения. Этот детектор высокоселективен, поскольку не все вещества легко окисляются или восстанавливаются.

Рефрактометрические детекторы являются универсальными, они находят применение, когда определяемые вещества не поглощают в УФ или видимой области спектра, не флуоресцируют и не обладают электрохимической активностью. Их принцип действия основан на измерении показателя преломления чистого растворителя и раствора определяемого вещества в этом растворителе. Вклад растворенного вещества в изменение показателя преломления растворителя пропорционален объемной концентрации этого вещества. При работе с рефрактометрическим детектором необходимо тщательно поддерживать температуру и не допускать пульсации потока (использовать демпфирующие устройства).

Пробы

Перед началом работы необходимо убедиться в совместимости хроматографической системы с пробой. В обращенно-фазовой ВЭЖХ нельзя вводить

пробы, содержащие хлорорганические, алифатические углеводороды и другие, плохо растворимые в воде соединения. Обычно перед анализом их испаряют, а остаток растворяют в дистиллированной воде или в подвижной фазе. Кроме того, полученные после экстракции экстракты или после сорбции элюаты должны полностью растворяться в подвижной фазе. Также необходимо обращать внимание на температуру плавления матрицы пробы и проводить термостатирование колонки выше указанной температуры. Необходимо обращать внимание на pH вводимой пробы и требования к кислотности производителя хроматографической колонки, и при необходимости проводить нейтрализацию.

3.2. Жидкостная хромато-масс-спектрометрия

Жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием (жидкостная хромато-масс-спектрометрия, ЖХ-МС) представляет собой гибридный аналитический метод качественного и количественного химического анализа сложных смесей, сочетающий хроматографическое разделение веществ в потоке жидкой подвижной фазы с их последующим масс-спектрометрическим анализом в элюате. В варианте *высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС, high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS)*, которая наиболее часто находит применение в химическом анализе, используются хроматографические колонки с размером частиц от 2 до 10 мкм и меньшими геометрическими размерами по сравнению с ВЭЖХ, совмещенной с другими способами детектирования. Метод обладает высокой чувствительностью и селективностью, позволяет определять вещества различной природы и полярности. Обязательным требованием является способность целевого вещества к ионизации в условиях, реализуемых в хромато-масс-спектрометре. Недостаток метода состоит в выраженных матричных эффектах при анализе объектов окружающей среды, биопроб, пищевых продуктов и других многокомпонентных систем. Для их устранения проводится соответствующая пробоподготовка, включающая выделение аналита из матрицы и переводение его в требуемую для анализа форму.

В отличие от газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием, в ЖХ-МС необходима дополнительная стадия формирования газофазных ионов из жидкого элюата путем его распыления, десольватации (удаления растворителя) и ионизации при атмосферном давлении в источнике ионов. Образовавшиеся ионы попадают в масс-спектрометр, где осуществляется их разделение по величине m/z в условиях вакуума, создаваемого роторным и турбомолекулярным насосом, с последующим детектированием (рис. 6). Скорость потока подвижной фазы не должна

превышать 0,3 мл/мин, что требуется для эффективного распыления элюата. Объем пробы, инжектируемый в колонку, варьируется от 1 до 50 мкл. Подвижная фаза, как правило, состоит из полярного органического растворителя (ацетонитрил, метанол) и водной среды (воды, раствора летучей кислоты (муравьиной, уксусной, трифторуксусной) или аммонийных солей данных кислот с концентрацией 0,05-0,2 моль/л). Наиболее часто применяются подвижные фазы с кислой реакцией среды, способствующей генерации положительно заряженных ионов за счет протонирования целевых молекул. При необходимости детектирования отрицательно заряженных ионов могут использоваться подвижные фазы с щелочной реакцией среды (водная среда – раствор аммиака или триэтиламина). В некоторых случаях находят применение буферные растворы, обеспечивающие требуемое значение рН для разделения и ионизации детектируемых соединений. Все компоненты подвижной фазы и матрицы пробы должны быть летучими или ионизируемыми для предотвращения загрязнения ионного источника и составляющих частей масс-спектрометра. Это правило нарушается лишь в редких случаях и требует проведения очистки прибора каждые несколько часов.

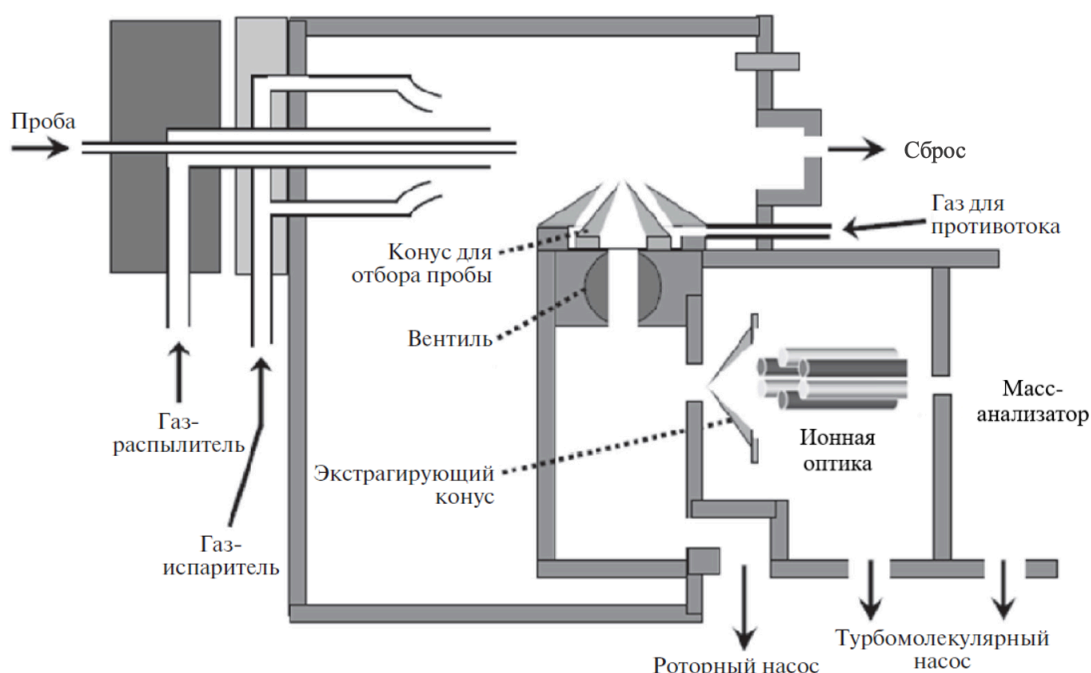


Рисунок 6. Принципиальная схема источника ионов (проба поступает из хроматографической системы).

ЖХ-МС предполагает применение «мягких» способов ионизации. Существует несколько способов ионизации: электрораспыление (electrospray ionization, ESI), химическая ионизация при атмосферном давлении (atmospheric pressure chemical ionization, APCI), фотоионизация при атмосферном давлении (atmospheric pressure ionization, API), матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (matrix assisted laser desorption/ionization, MALDI).

Электрораспыление наиболее распространено, в то время как остальные методы ионизации реже реализуются в практике ЖХ-МС. Эти процессы называются «мягкими», так как фрагментация молекулы либо незначительна, либо полностью отсутствует. В зависимости от кислотности подвижной фазы образуются квазимолекулярные ионы $[M+nH]^{n+}$ (присоединение протона (-ов)) или $[M-nH]^{n-}$ (отрыв протона (-ов)) либо аддукты состава $[M+nX]^{n+}$ или $[M+nX]^{n-}$, где M – молекула целевого вещества, X – положительно (NH_4^+ , K^+ , Na^+) или отрицательно заряженный ион ($HCOO^-$, Cl^-), присутствующий в подвижной фазе, а n – количество ионов, присоединившихся к молекуле или оторвавшихся от нее. Знак и величина заряда молекулярного иона или аддукта зависит от природы, количества и способности к ионизации функциональных групп в структуре молекулы, а также состава подвижной фазы и условий ионизации.

Общим для всех способов ионизации, кроме матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации, является распыление элюата, поступающего по капилляру из хроматографической системы, на зонде (игле) при помощи нагретого азота с образованием спрея, состоящего из очень мелких капель, которые затем испаряются в ионном источнике, а также транспорт образовавшихся ионов с помощью конуса, находящего под напряжением, в масс-спектрометр.

При электрораспылении к распылительной игле прикладывается электрический потенциал (несколько кВ), капли элюата накапливают электрические заряды на своей поверхности, уменьшаются и частично десольватируются из-за испарения растворителя. Уменьшение размера капли приводит к резкому возрастанию заряда на ее поверхности, увеличению сил отталкивания между одноименно заряженными ионами (кулоновское взаимодействие) и разрыву капли до полной десольватации. Электрораспыление применимо для ионных и полярных соединений, которые обладают зарядом в выбранных условиях анализа. Напряжение, которое приложено к игле, должно быть положительным в случае определения положительно заряженных ионов, и отрицательным – при детектировании отрицательно заряженных ионов.

Химическая ионизация при атмосферном давлении отличается тем, что к распылительной игле не приложено напряжение, при этом рядом с ней в распылительной

камере расположен электрод коронного разряда (проводник, находящийся под высоким напряжением). Возникающий разряд ионизирует молекулы растворителя (S) в газовой фазе с образованием дочерних ионов (например, SH^+), которые затем передают заряд молекулам аналита (M) с формированием соответствующих ионов (например, MH^+). В зависимости от приложенного напряжения возможен режим как положительной, так и отрицательной ионизации. Химическая ионизация более эффективна для менее полярных молекул по сравнению с электрораспылением.

Фотоионизация при атмосферном давлении схожа с химической ионизацией, но вместо электрода коронного разряда используется ультрафиолетовая лампа. Высокоэнергетичные фотоны напрямую или косвенно ионизируют молекулы аналита с образованием катионов или катион-радикалов. Косвенная ионизация протекает за счет переноса энергии от заряженной молекулы растворителя (компонента подвижной фазы), полученной в результате взаимодействия с ультрафиолетовым излучением, к молекуле аналита. Повышение эффективности процесса достигается путём введения в подвижную фазу допантов (ацетон, толуол). Фотоионизация позволяет проводить определение слабополярных и неполярных веществ (например, полициклических ароматических углеводородов).

В отличие от рассмотренных методов ионизации, в которых генерация ионов происходит непрерывно, матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация осуществляется в другом аппаратном оформлении из-за импульсного характера процесса. Элюент после выхода из колонки направляется в устройство точечного нанесения, которое представляет собой платформу с луночным планшетом и подвижной иглой, дозирующей дискретные порции смеси элюента и раствора матрицы объемом от 50 нл в лунки. После завершения хроматографического процесса растворитель испаряют, и в каждой лунке протекает сокристаллизация молекул аналита и матрицы. Наиболее часто в качестве матриц используют органические кислоты с ароматическими циклами в структуре (например, 2,5-дигидроксибензойную кислоту) в связи с тем, что они хорошо поглощают в ультрафиолетовой области спектра и способны донировать H^+ молекулам аналита. Планшет с сокристаллизованными образцами помещают в масс-спектрометр, где происходит их последовательное облучение короткими лазерными импульсами ультрафиолетового излучения с длиной волны 300-350 нм. Поглощение энергии лазера молекулами матрицы приводит к их взрывному переносу вместе с молекулами аналита в газовую фазу. Ионизация аналита происходит вследствие реакций, протекающих в образовавшейся плазме. Получившиеся катионы, которые практически всегда однозарядны, направляются в масс-анализатор. Метод наиболее часто применяют для

определения структуры и содержания сложных синтетических и природных полимеров. Недостаток метода заключается в сложности достижения гомогенности сокристаллизованных образцов.

Масс-спектрометры в ЖХ-МС

Стоит отметить, что хромато-масс-спектрометрия предполагает непрерывные измерения масс-спектров в процессе хроматографирования, т.е. для каждой точки на хроматограмме регистрируется масс-спектр или определенная полоса/переход. Чаще всего для получения масс-спектра используются квадрупольные анализаторы (рис. 7), а детектором служат электронные умножители, которые генерируют вторичные токи при попадании на них ионов (усиление происходит в 10^4 - 10^8 раз). Квадруполь состоит из четырех параллельных стержней, к которым приложено переменное и постоянное напряжение, создающее квадрупольное поле, способное фокусировать, удерживать и анализировать ионы с определенным отношением m/z . При постепенном изменении напряжения проводится сканирование в требуемом диапазоне отношений m/z со скоростью до 1000 атомных единиц массы (а.е.м.) в секунду и точностью до 0,1 а.е.м. для получения масс-спектра. Для повышения чувствительности используют режим мониторинга заданных ионов (single ion monitoring, SIM), в котором проводится детектирование только определенного иона или ионов, образованных целевым веществом. Для реализации описанных режимов достаточно масс-анализатора с одним квадруполем.

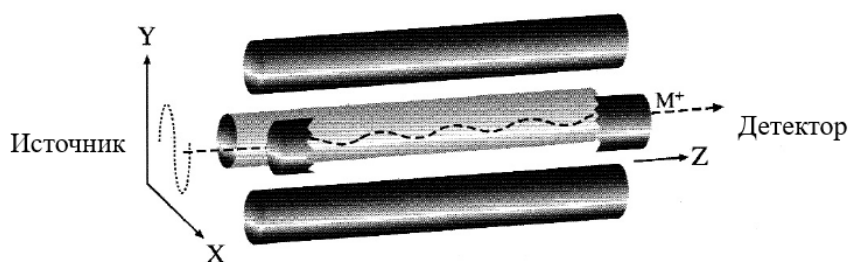


Рисунок 7. Схематическое изображение квадруполя.

Дальнейшее повышение чувствительности и селективности стало возможным при появлении тандемных (тройных) квадрупольных масс-спектрометров (рис. 8), функционирующих в режиме мониторинга множественных реакций (multiple reaction monitoring, MRM). Совмещение их с жидкостными хроматографами привело к возникновению метода тандемной жидкостной хромато-масс-спектрометрии (HPLC-MS/MS). При этом масс-анализатор вместо одного квадруполя содержит три, каждый из которых выполняет определенную функцию. Первый квадруполь (Q1) выделяет

молекулярный ион аналита (выделен зеленым цветом на рис. 8). Во втором квадруполе (Q2) поддерживается низкое давление азота или аргона (остальные части анализатора находятся в вакууме). Он служит камерой соударений, в которой молекулярный ион подвергается фрагментации при взаимодействии с молекулами инертного газа. Третий квадруполь служит для отделения конкретного продукта фрагментации (фрагментный ион, выделен красным цветом на рис. 8), который попадает в детектор. За счет быстрого перехода от одного напряжения на каждом квадруполе к другому для одного и того же хроматографического пика фиксируется сразу два или три перехода (Q1 → Q3), соответствующих различным продуктам фрагментации исходного молекулярного иона. Один из них, дающий наибольшую интенсивность, используется для количественного определения, а оставшиеся – для качественной идентификации аналита (наличие переходов, соотношение интенсивностей между ними).

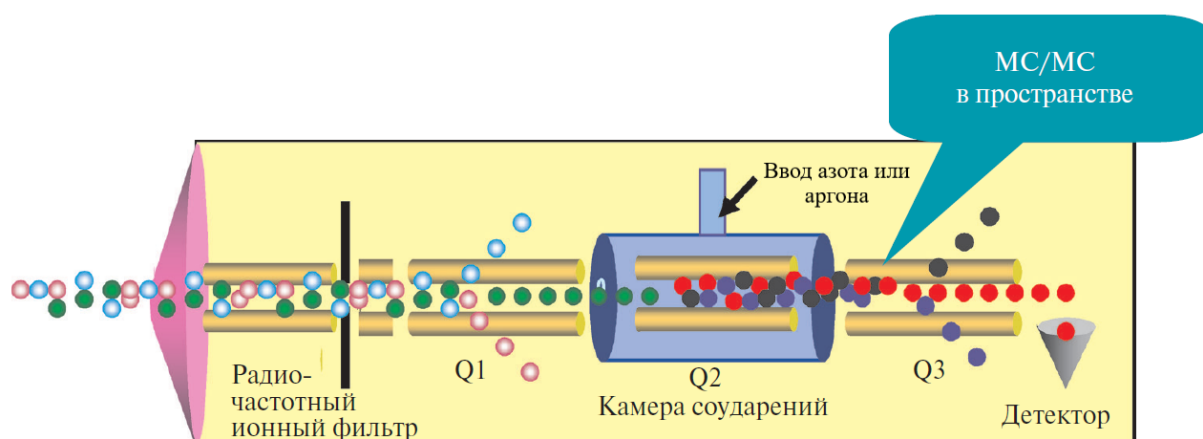


Рисунок 8. Принцип действия тройного квадрупольного масс-спектрометра.

Помимо квадрупольных применяются также времяпролетные масс-спектрометры (time-of-flight, TOF), в которых разделение ионов осуществляется за счет их одновременного ускорения под действием высокого напряжения. Кинетическая энергия всех ионов ($E_{\text{кин}}$) эквивалентна и выражается следующим уравнением:

$$E_{\text{кин}} = \frac{mV^2}{2} = qU,$$

где m – масса иона;

V – скорость движения иона;

q – заряд иона;

U – напряжение.

Таким образом, масса каждого иона обратно пропорциональна квадрату скорости его движения и определяется таким выражением:

$$m = \frac{2qU}{V^2}$$

В этом случае скорость и время прохождения ионов по трубке анализатора будет зависеть от отношения m/z , что приведёт к их пространственному разделению (тяжёлые ионы будут двигаться медленнее легких). Данные анализаторы преимущественно применяются для получения масс-спектров с высокой скоростью и точностью после матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации.

4. Ионная хроматография

Ионная хроматография – это высокоэффективная жидкостная хроматография для разделения катионов и анионов на ионообменниках низкой емкости. Широкое распространение ионной хроматографии обусловлено рядом ее достоинств:

- возможность определять большое число неорганических и органических ионов;
- высокая чувствительность определения (до 1 мкг/л без предварительного концентрирования);
- широкий диапазон определяемых концентраций;
- высокая селективность и экспрессность;
- малый объем анализируемой пробы (не более 2 мл).

Вместе с тем, как и любой аналитический метод, ионная хроматография не лишена недостатков, к которым можно отнести:

- более низкую эффективность разделения по сравнению с жидкостно-адсорбционной хроматографией;
- необходимость высокой коррозионной стойкости хроматографической системы, особенно при определении катионов.

Данный метод основан на эквивалентном обмене ионов раствора на ионы неподвижной твердой фазы. Свойствами ионообменников обладает довольно большое число различных природных и синтетических соединений. Наибольшее практическое применение нашли синтетические органические иониты. Большинство этих ионообменников имеет матрицу из сополимера стирола с дивинилбензолом. Этот сополимер легко образуется и обладает достаточно высокой физической и химической устойчивостью в различных условиях. Полимер может быть использован в качестве ионообменника только после введения в матрицу ионогенных групп. Ионогенная группа состоит из двух ионов. Один из них прочно фиксируется за счет ковалентной связи и называется функциональной группой (фиксированным ионом). Ионы противоположенного заряда связываются с фиксированным ионом за счет

электростатического взаимодействия. Они называются противоионами. Эти ионы могут обмениваться на эквивалентное количество ионов того же заряда из раствора.

Устройство ионного хроматографа, функционирующего по двухколоночной схеме, представлено на рис. 9. Система включает в себя следующие компоненты: насос для подачи подвижной фазы (элюента), разделяющую колонку, подавительную колонку и проточный детектор. Наличие подавительной колонки обеспечивает детектирование на фоне слабой кислоты или деионизованной воды, обладающими низкой фоновой электропроводностью. По сравнению с одноколоночной схемой двухколоночная схема позволяет снизить пределы обнаружения ионов-аналитов при использовании универсального для ионной хроматографии детектора по электропроводности.

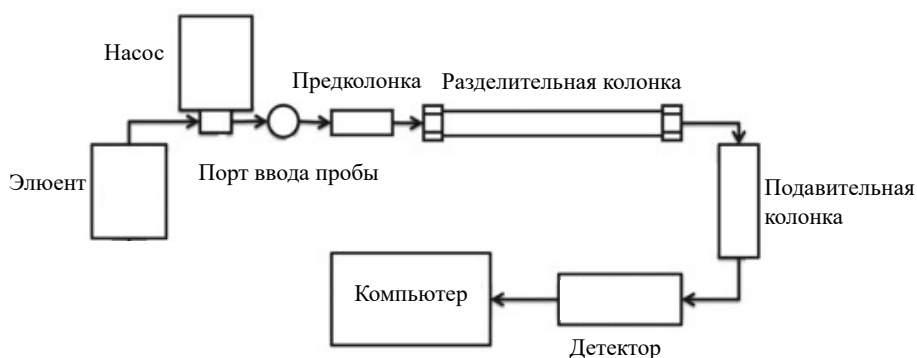


Рисунок 9. Блок-схема ионного хроматографа.

Разделительная колонка

В настоящее время в ионной хроматографии применяются два типа неподвижных фаз: ионообменники с функциональными группами на поверхности непористых материалов, например, стеклянных шариков и объемно-пористые ионообменники, в которых функциональные группы расположены непосредственно на поверхности полимера или в его порах. Неподвижная фаза представляет собой сорбент состоящий, в основном, либо из полимерных ионообменных смол (обычно сополимеры стирола и дивинилбензола с привитыми ионообменными группами), либо являющихся силикагелем с привитыми ионообменными группами. Для ионной хроматографии возможно использование сорбентов на основе сферических частиц непористого стекла или высокопрочного полимера, покрытых тонким слоем пористого ионообменника.

Макромолекулы катионитов содержат кислотные группы различной силы, например, такие как сульфогруппы, карбоксильные и гидроксифенильные и другие группы ($-\text{SO}_3^-$, $-\text{AsO}_3^-$, $-\text{COOH}$, $-\text{PO}_3^-$ и др.).

Макромолекулы анионитов, наоборот, имеют в своем составе основные группы, например, алифатические или ароматические аминогруппы различной степени замещенности ($-\text{NH}_3^+$, $-\text{R}_3\text{N}^+$, $-\text{R}_2\text{HN}^+$, $-\text{RH}_2\text{N}^+$).

В зависимости от силы сопряженной кислоты (или основания) фиксированного иона ионообменники делятся на сильнокислотные, среднекислотные и слабокислотные (или основные). Классификация ионообменников представлена в табл. 2.

Таблица 2. Классификация ионообменников.

| Ионообменник | Тип | Фиксированные ионы |
|---------------------|-----------------|--|
| Катионообменник | сильнокислотный | $-\text{SO}_3^-$ |
| | среднекислотный | $-\text{PO}_3^-$, $-\text{AsO}_3^-$ |
| | слабокислотный | $-\text{COOH}$ |
| Анионообменник | сильноосновный | $-\text{R}_3\text{N}^+$ |
| | среднеосновный | $-\text{R}_3\text{N}^+$, $-\text{R}_2\text{HN}^+$ |
| | слабоосновный | $-\text{RH}_2\text{N}^+$ |

Подавительная колонка

Для подавления собственной электропроводности подвижной фазы и повышения чувствительности метода в ионной хроматографии возможно использование подавляющих колонок. С помощью колоночного подавления раствор подвижной фазы с собственными ионами и высокой электропроводностью превращается при ионном обмене в малодиссоциированный и обладающий очень малой электропроводностью раствор. Определяемые ионы при этом не претерпевают никаких химических превращений и сохраняют свою электропроводность. При определении анионов подавляющую колонку заполняют катионообменником высокой емкости в Н-форме. При определении катионов подавляющую колонку заполняют анионообменником высокой емкости в ОН-форме. Эта колонка устанавливается после разделяющей перед кондуктометрическим детектором. Недостаток использования подавляющих колонок состоит в том, что после определенного времени работы (обычно не более 10 ч) емкость ионообменника падает, и его необходимо регенерировать.

Детекторы

В ионной хроматографии наиболее часто используют кондуктометрические детекторы, которые измеряют низкочастотную проводимость элюата. Они просты по конструкции, имеют малый рабочий объем (до 0,5 мкл) и обеспечивают широкий диапазон определяемых концентраций. Детектор состоит из проточной ячейки, в которую подается анализируемый раствор, и системы регистрации кондуктометрического сигнала. Кондуктометрическая ячейка представляет собой камеру малого объема, соединенную с двумя электродами, сделанными из платины, золота, нержавеющей стали или другого инертного проводящего материала. Сопротивление ячейки, как правило, измеряют с помощью моста Уитстона. Электропроводность большинства растворов возрастает примерно на 2 % при увеличении температуры на 10 °С, поэтому в кондуктометрических детекторах предусмотрена температурная компенсация.

Подвижные фазы

В качестве подвижной фазы в ионной хроматографии используются растворы электролитов. Элюенты, предназначенные для двухколоночной системы, должны содержать ионы, отвечающие двум основным требованиям. Во-первых, они должны иметь сродство к иониту, близкое к разделяемым ионам. Во-вторых, они должны вступать в реакции обмена в подавительной колонке с образованием воды или других слабодиссоциирующих соединений, обладающих низкой электропроводностью. В идеальном случае элюирующий ион должен иметь несколько большее сродство к иониту в разделительной колонке, чем наиболее прочно удерживаемый определяемый ион. На практике выбор элюента существенно зависит от решаемой аналитической задачи. В табл. 3 приведены некоторые применяемые элюенты.

Таблица 3. Элюенты, применяемы в двухколоночной ионной хроматографии.

| Элюент – водный раствор | Элюирующая сила |
|-----------------------------------|-----------------|
| $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ | Очень слабая |
| NaOH | Слабая |
| NaHCO_3 | Умеренная |
| Na_2CO_3 | Средняя |

Элюенты, содержащие тетраборат натрия, обладают очень низкой способностью к вытеснению и применяются редко. Однако они находят применение для разделения

быстроэлюируемых ионов, таких как фторид, формиат и ацетат. Борат натрия в результате конверсии в подавительной колонке образует слабую борную кислоту.

Элюент, содержащий гидроксид натрия, с точки зрения компенсации фонового сигнала является идеальным, поскольку в подавительной колонке он образует воду. Недостатком этого элюента является его низкое сродство к ионитам, что обеспечивает вытеснение только слабоудерживаемых анионов. Увеличение концентрации гидроксида натрия в растворе повышает его способность к вытеснению, но вызывает быструю отработку подавительной колонки. Гидроксид натрия также добавляют к другим элюентам, таким, как растворы гидрокарбоната и карбоната натрия.

Благодаря своему заряду карбонат-ион обладает средней элюирующей силой, и его можно использовать в сравнительно низких концентрациях. Чаще всего применяются элюенты, которые представляют собой буферные растворы, приготовленные смешением карбоната и гидрокарбоната. Селективность такого элюента можно легко изменить, меняя соотношение компонентов, т.е. меняя значение рН элюента. Кроме того, чтобы обеспечить быстрое или медленное элюирование, не влияя на порядок выхода определяемых ионов, можно просто изменить концентрацию элюента.

Как правило, подбирают такой элюент, который обеспечивает время удерживания наиболее удерживаемого иона в диапазоне 20-25 мин. Выбор элюента зависит от числа и характера определяемых ионов. Низкая концентрация элюента обеспечивает селективность разделения и больший ресурс подавляющей колонки. Концентрация элюентов для двухколоночной ионной хроматографии обычно колеблется в диапазоне от 1 до 10 ммоль/л.

5. Количественный хроматографический анализ

Цель количественного хроматографического анализа – определение массы или концентрации аналита в пробе на основании результата измерения одного из параметров пика (площади или высоты), значение которого рассчитывается при обработке хроматограммы. Как правило, в хроматографии зависимость параметра пика (P) от массы аналита в пробе (m), введенной в хроматограф, выглядит следующим образом:

$$P = km,$$

где k – коэффициент (постоянная величина).

При проведении анализа решается обратная задача, которая состоит в нахождении массы или концентрации аналита, поэтому вышеуказанное выражение примет следующий вид:

$$m = \frac{P}{k}$$

Площадь пика используют при достаточно хорошем разрешении ($R_s > 1$), она менее подвержена влиянию колебания хроматографических условий (расхода подвижной фазы, температуры). Высоту пика выбирают для расчета концентрации аналита в случае плохого разрешения ($R_s < 1$), что позволяет снизить влияние неполного разделения пиков на результат анализа.

Существуют следующие варианты количественного хроматографического анализа:

- метод абсолютной градуировки;
- метод внешнего стандарта;
- метод внутреннего стандарта;
- метод стандартной добавки;
- метод внутренней нормализации.

Метод абсолютной градуировки (calibration) является наиболее универсальным и основан на построении градуировочной зависимости между параметром пика и массой или концентрацией аналита. Сначала готовят серию градуировочных растворов или газовых смесей с возрастающей концентрацией аналита, регистрируют хроматограммы для каждого или каждой из них. Выбирают диапазон концентраций таким образом, чтобы в него входили ожидаемые концентрации аналита в пробах. Потом проводят обработку полученных данных по методу наименьших квадратов, находят уравнение градуировочной зависимости вида:

$$P = k' C,$$

где k' – градуировочный коэффициент;

C – концентрация аналита в растворе.

В хроматографии при использовании большинства детекторов градуировочная зависимость представляет собой прямую линию, проходящую через начало координат. При анализе пробы измеряют значение параметра пика аналита (P_x) и рассчитывают его концентрацию (C_x) в пробе по формуле:

$$C_x = \frac{P_x}{k'}$$

При построении градуировочной зависимости в широком концентрационном диапазоне для некоторых детекторов, например, пламенно-фотометрического, могут наблюдаться отклонения от линейности, которые можно устранить путем расчета соотношений параметра пика и концентрации аналита в логарифмическом виде:

$$\log P = k'' \log C,$$

где k'' – градуировочный коэффициент при представлении зависимости в логарифмическом виде.

Метод абсолютной градуировки позволяет проводить анализ даже при недостаточно полном разделении пиков аналита и сопутствующих веществ. Несмотря на то, что получение градуировочной зависимости является трудоемким, далее возможно проведение анализа большого количества проб подряд. При этом зачастую достаточно использования градуировочных растворов аналита в любом подходящем растворителе. Например, при определении органических кислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с фотометрическим детектированием в ультрафиолетовой и видимой области спектра (ВЭЖХ-УФ) во фруктовых и овощных соках градуировку проводят по водным растворам кислот.

В случаях, когда нет необходимости анализировать большую серию проб, проведение градуировки становится нецелесообразным, поэтому прибегают к *методу внешнего стандарта (external standard)*. Перед определением аналита в пробе проводят анализ лишь одного градуировочного раствора или газовой смеси (внешнего стандарта). Для получения правильных результатов необходимо, чтобы зависимость параметра пика аналита от его массы или концентрации была линейна и проходила через начало координат, наблюдалось достаточное хорошее разрешение пиков на хроматограмме, а концентрации аналита в пробе и внешнем стандарте были сопоставимы.

Концентрацию аналита в пробе (C_x) рассчитывают по формуле:

$$C_x = \frac{C_{st} \cdot P_x}{P_{st}},$$

где C_{st} – концентрация аналита во внешнем стандарте;

P_x – параметр пика аналита для реальной пробы;

P_{st} – параметр пика аналита для внешнего стандарта.

Экспрессный и экономичный метод внешнего стандарта не уступает по точности методу абсолютной градуировки при условии соблюдения упомянутых выше условий.

Метод внутреннего стандарта (internal standard) применяется для устранения недостатка, присущего методам абсолютной градуировки и внешнего стандарта, который заключается в существенном вкладе случайной погрешности объема пробы, вводимой в хроматограф. В этом методе в пробу вводят известное количество внутреннего стандарта – вещества, которое отсутствует в пробе и сходно по химической природе с аналитом. Пик внутреннего стандарта не должен перекрываться ни с одним из пиков компонентов пробы, а его параметры удерживания должны быть близки к таковым для аналита.

Для расчета концентрации аналита в пробе (C_x) используют следующую формулу:

$$C_x = \frac{F_g \cdot C_{st} \cdot P_x}{P_{st}},$$

где F_g – отношение параметров пиков внутреннего стандарта и аналита при их равных концентрациях в пробе;

C_{st} – концентрация внутреннего стандарта в пробе;

P_x – параметр пика аналита;

P_{st} – параметр пика внутреннего стандарта.

Метод внутреннего стандарта позволяет уменьшить случайную погрешность измерений, однако несколько увеличивается систематическая погрешность за счет необходимости определения постоянной F_g . Кроме того, метод позволяет учесть вариабельность степени извлечения аналита из образцов на стадии пробоподготовки из-за матричных эффектов (степени извлечения аналита и внутреннего стандарта будут изменяться аналогично), что повышает точность анализа.

В *методе стандартных добавок (standard addition)* в пробу вводят добавку раствора аналита таким образом, чтобы разбавление пробы было минимальным и им можно было пренебречь, а концентрация аналита в пробе увеличилась в 2-3 раза. При этом результат анализа (C_x) рассчитывают по формуле:

$$C_x = \frac{C_d \cdot P_x}{P_{x+d} - P_x},$$

где C_d – увеличение концентрации аналита в пробе после введения добавки;

P_x – параметр пика аналита до введения добавки в пробу;

P_{x+d} – параметр пика аналита после введения добавки в пробу.

Для повышения точности может вводиться серия добавок, а искомый результат может определяться после экстраполяции линейной зависимости P_x от C_d . Главным преимуществом метода добавок является устранение матричного влияния сложных по составу образцов и снижение систематической погрешности, связанной с этим. При анализе большого количества проб метод является трудоемким, особенно при введении серии добавок.

Метод внутренней нормализации (normalization) является самым простым из перечисленных. Его суть состоит в том, что суммарную площадь всех зарегистрированных пиков (S_{sum}) принимают равной 100 %, а содержание одного из компонентов (C_x) рассчитывают по формуле:

$$C_x = \frac{S_x}{S_{sum}} \cdot 100\%,$$

где S_x – площадь пика одного из компонентов.

Данный метод основан на допущении, что все компоненты пробы регистрируются детектором с одинаковой чувствительностью, что на практике достижимо только в

ограниченном количестве случаев. В связи с этим метод внутренней нормализации используют для примерной оценки содержания компонентов в смесях, для которых коэффициенты чувствительности детектора к данным компонентам близки, или априорно известны. Это условие выполняется, например, при газохроматографическом анализе нефтепродукта с применением ПИД для определения углеводородного состава. В этом случае приведенная выше расчетная формула определяет молярную долю того или иного углеводорода в пробе, поскольку сигнал ПИД пропорционален числу атомов углерода в молекуле аналита. Когда используют более селективные детекторы, например ЭЗД, метод внутренней нормализации неприменим. По сравнению с другими методами количественного хроматографического анализа этот метод самый экспрессный, но наименее точный.

6. Капиллярный электрофорез

Метод *капиллярного электрофореза* (*Capillary Electrophoresis, КЭ*) является гибридным методом анализа, сочетающим разделение заряженных частиц в кварцевом капилляре, заполненном раствором фонового электролита (ФЭ), под действием внешнего электрического поля и детектирование зон разделенных компонентов смеси.

Для реализации метода капилляр заполняется раствором ФЭ, и после введения пробы и подачи напряжения компоненты смеси начинают двигаться к детектору с разной скоростью, которая зависит от массы и заряда частицы. При этом наблюдается электроосмотический поток (ЭОП) – течение жидкости в капилляре под действием приложенного электрического поля. Нейтральные компоненты в этом режиме капиллярного электрофореза не могут быть разделены, они мигрируют в зоне ЭОП. В результате непрерывного детектирования формируется электрофореграмма, на которой каждому отдельному пику соответствует отдельное вещество в смеси. Количественно можно судить о концентрации компонента в пробе по площади или высоте пика (она пропорциональна концентрации), а качественно – по времени миграции. Время миграции (t_m) – это время прохождения центром зоны компонента эффективной длины капилляра ($L_{эф}$) – расстояния от точки ввода пробы (начала капилляра) до точки детектирования.

Обычно в системах КЭ (рис. 10) применяются кварцевые капилляры с внешним полиимидным защитным покрытием. Внутренний диаметр капилляров составляет 50-75 мкм, внешний диаметр – 365 мкм, общая длина 30-100 см. В капилляр вводится проба объемом 1-20 нл. Высоковольтные источники питания обеспечивают необходимую разность потенциалов (до 30 кВ). Наиболее часто выполняют фотометрическое детектирование компонентов непосредственно в капилляре в режиме реального времени.

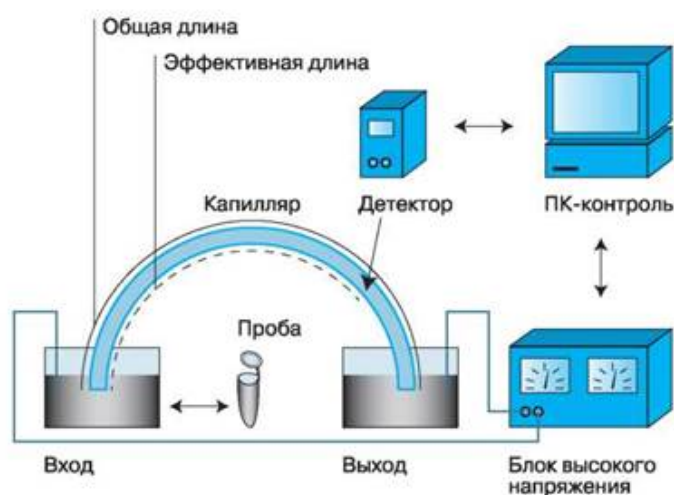


Рисунок 10. Устройство системы капиллярного электрофореза.

Для того чтобы получить представление о методе КЭ, необходимо рассмотреть ряд процессов, происходящих в капилляре, заполненном раствором ФЭ и помещенном в продольное электрическое поле.

На поверхности кварцевого капилляра находятся силоксановые группы $\text{Si}=\text{O}$, которые при введении водного раствора ФЭ гидролизуются, образуя силанольные группы $\text{Si}-\text{OH}$. В первую очередь скорость и степень гидролиза силоксановых групп зависят от рН введенного раствора ФЭ. Уже при $\text{pH} > 3$ происходит диссоциация силанольных групп и поверхность капилляра приобретает отрицательный заряд, возрастающий при увеличении рН раствора.

Именно благодаря диссоциации силанольных групп на границе между стенкой кварцевого капилляра и раствором образуется двойной электрический слой (ДЭС). ДЭС и сам имеет несколько «слоев»: первый слой состоит из силанольных групп, заряженных отрицательно, второй слой – из положительно заряженных катионов. Причем у второго слоя есть часть, непосредственно приближенная к поверхности кварца (неподвижный слой), а есть также диффузная составляющая (диффузный слой), находящаяся на некотором расстоянии от поверхности капилляра.

Из-за того, что гидратация увеличивает размер ионов, количество положительных зарядов в неподвижном слое меньше, чем отрицательных, поэтому в диффузной части имеется избыток катионов. Именно между этими слоями находится граница скольжения – при наложении электрического поля диффузная часть начинает смещаться к катоду, а вместе с ней и весь раствор в капилляре, неподвижная же часть остается на месте.

Возникает ЭОП, который осуществляет перенос раствора в капилляре, скорость его зависит от рН (чем выше водородный показатель, тем большую скорость имеет ЭОП), концентрации компонентов в фоновом электролите (зависимость обратная – при большем количестве катионов толщина диффузной части меньше), вязкости раствора, диэлектрической проницаемости, температуры.

Важной особенностью ЭОП в капиллярном электрофорезе является его плоский профиль (рис. 11). При движении зон компонентов в ЭОП не возникает их размытие как в ламинарном потоке. Такая особенность ЭОП обуславливает минимальное уширение пиков на электрофореграмме и, как следствие, высочайшую эффективность метода КЭ.

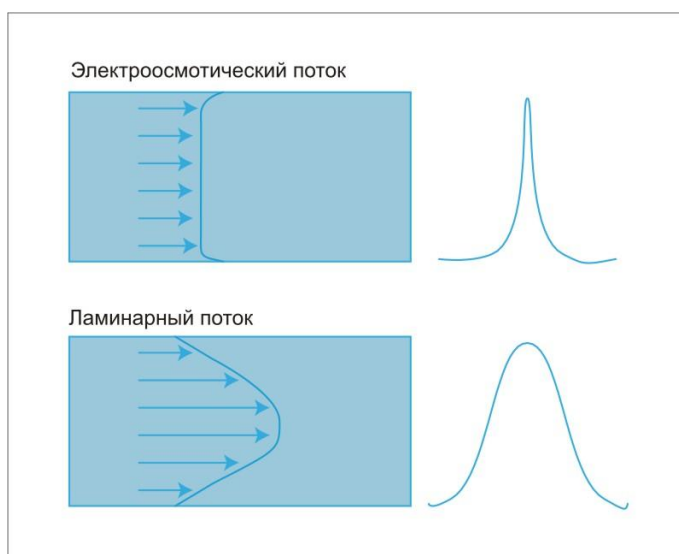


Рисунок 11. Влияние профиля потока на ширину зоны вещества.

Различают собственную электрофоретическую подвижность частицы ($\mu_{эф}$) и подвижность ЭОП ($\mu_{эоп}$).

Время, необходимое жидкости для преодоления эффективной длины капилляра вследствие возникающего ЭОП, называют временем ЭОП ($t_{эоп}$) и экспериментально определяют из электрофореграммы по времени миграции нейтрального компонента – маркера ЭОП.

Подвижность ЭОП ($\mu_{эоп}$) – представляет собой отношение скорости ($V_{эоп}$) к напряженности электрического поля (E).

$$\mu_{эоп} = \frac{V_{эоп}}{E}$$

Скорость ЭОП ($V_{эоп}$) положительна при направлении движения жидкости от входного участка капилляра (анода) к детектору и отрицательна при обратном направлении.

Скорость ЭОП вычисляют как:

$$V_{\text{ЭОП}} = L_{\text{эф}}/t_{\text{ЭОП}},$$

где $L_{\text{эф}}$ – эффективная длина капилляра ($L_{\text{эф}}$); $t_{\text{м}}$ – время миграции.

Напряженность электрического поля представляет собой отношение приложенной разности потенциалов (U) к общей длине капилляра ($L_{\text{общ}}$):

$$E = \frac{U}{L_{\text{общ}}}.$$

Таким образом, подвижность ЭОП вычисляют из экспериментальных данных:

$$\mu_{\text{ЭОП}} = L_{\text{общ}}L_{\text{эф}}/t_{\text{ЭОП}}U.$$

Традиционно при расчете подвижностей длину капилляра выражают в сантиметрах, время миграции в секундах, а разность потенциалов в вольтах.

Электрофоретическая подвижность частицы ($\mu_{\text{эф}}$) по аналогии с предыдущей величиной представляет собой отношение электрофоретической скорости частицы к напряженности электрического поля и может быть вычислена:

$$\mu_{\text{эф}} = L_{\text{общ}}L_{\text{эф}}/t_{\text{м}}U.$$

В отличие от $\mu_{\text{ЭОП}}$ электрофоретическую подвижность частицы нельзя найти непосредственно из электрофореграммы, поскольку время миграции частицы ($t_{\text{м}}$) в этом случае представляет собой сумму времен миграции собственно частицы и маркера ЭОП.

Из эксперимента можно найти так называемую общую подвижность, которая выражается (при положительной скорости ЭОП):

$$\mu_{\text{общ}} = \mu_{\text{ЭОП}} + \mu_{\text{эф}}.$$

Зная из эксперимента $\mu_{\text{общ}}$ и $\mu_{\text{ЭОП}}$ можно рассчитать $\mu_{\text{эф}}$.

На рис. 12 схематично показано разделение частиц в капилляре под действием приложенного электрического поля. ЭОП движется в сторону катода. Общая электрофоретическая подвижность катионов складывается из электрофоретической подвижности катионов и подвижности ЭОП. Общая электрофоретическая подвижность анионов является разностью подвижности ЭОП и электрофоретической подвижности анионов. В свою очередь электрофоретическая подвижность частицы прямо пропорциональна заряду и обратно пропорциональна размеру частицы. Таким образом, в случае частиц с одинаковым зарядом и разных размеров первыми достигают катода катионы с меньшим радиусом, потом катионы с большим радиусом, затем нейтральные частицы вместе с ЭОП, анионы с большим радиусом и анионы с меньшим радиусом.

выходит из колонки. В случае полярных фаз имеют значение также дипольные моменты молекул разделяемых веществ и их способность к донорно-акцепторному взаимодействию.

При анализе жидкостей определенный объем (обычно несколько мкл) пробы отбирается в микрошприц и с его помощью вводится в хроматограф через испаритель. В испарителе происходит превращение жидкой пробы в пар. Парообразная проба в потоке газа-носителя поступает к хроматографическую колонку, где происходит разделение содержащихся в пробе компонентов. Разделенные зоны компонентов, которые с различной скоростью перемещаются по колонке, поступают в детектор и регистрируются последним в виде пиков.

Площадь и высота пиков на полученной хроматограмме, которые выступают в качестве аналитических сигналов, пропорциональны концентрации компонентов в пробе. В хроматографии взаимосвязь между параметрами пиков и концентрацией определяемых веществ в пробе довольно часто отражает прямая линия, проходящая через начало координат. Установление этой взаимосвязи проводят на стадии градуировки.

При проведении любого хроматографического анализа необходим этап идентификации определяемых веществ, который состоит в соотнесении пиков на хроматограмме с тем или иным определяемым веществом. Если аналитик имеет в своем распоряжении определяемые вещества, то эта задача решается относительно просто. В хроматограф по отдельности вводят все определяемые вещества и регистрируют их времена удерживания. Затем в хроматограф дозируют анализируемую пробу и при тех же условиях регистрируют времена удерживания компонентов, присутствующих в пробе. Сопоставляя времена удерживания компонентов в пробе и чистых компонентов, проводят их идентификацию, то есть соотносят тот или иной пик на полученной хроматограмме с тем или иным компонентом. Если же определяемых веществ в распоряжении аналитика нет, то необходимо знать последовательность выхода компонентов при использовании данной стационарной фазы.

Используемые средства измерений, оборудование и реактивы

- лабораторный газовый хроматограф Хроматэк Кристалл 5000.2 с пламенно-ионизационным детектором;
- микрошприц вместимостью 10 мкл;
- кварцевая капиллярная колонка длиной не менее 10 м с неполярной (полиметилсилоксановой) стационарной жидкой фазой, например, ВРХ-1;
- индивидуальные растворы *трет*-бутилового, *втор*-бутилового, изобутилового и *н*-бутилового спиртов в дистиллированной воде с концентрациями 100 мг/л;

- градуировочные растворы смеси *трет*-бутилового, *втор*-бутилового, изобутилового и *н*-бутилового спиртов с концентрациями 40, 100 и 200 мг/л.

Подготовка к работе

Перед проведением градуировки студенты в присутствии преподавателя или инженера знакомятся с устройством хроматографа и микрошприца, овладевают техникой дозирования жидких проб в испаритель газового хроматографа.

При выполнении работы необходимо выполнять следующие правила:

- перед введением пробы в испаритель хроматографа необходимо, чтобы на панели хроматографа светился зеленый индикатор «Готовность»;
- при смене анализируемого раствора шприц не менее 5 раз промывают раствором, который собираются вводить;
- перед введением пробы в испаритель хроматографа необходимо тщательно протереть иглу микрошприца кусочком фильтровальной бумаги и приподнять шток шприца, чтобы анализируемая жидкость не находилась в игле при вводе в инжектор.

Условия хроматографического анализа

Температура испарителя – 150 °С, температура детектора – 250 °С, расход водорода – (20-25) мл/мин, расход воздуха – (200-250) мл/мин, температура термостата колонок – 60 °С, деление потока – 1/3.

Идентификация бутиловых спиртов

В испаритель газового хроматографа вводят 0,5 мкл раствора *трет*-бутилового спирта и сразу нажимают на кнопку «Старт/Стоп» на панели хроматографа. После нажатия этой кнопки начинается запись хроматограммы, отображаемая на мониторе компьютера. Если этого не происходит, нажимают красную стрелку → (вправо) на верхней панели инструментов.

В открывающемся автоматически паспорте хроматограммы на вкладке «Проба» в поле «Название пробы» пишут «трет-бутиловый», после чего паспорт закрывают, нажав кнопку «Закрыть». Запись хроматограммы завершается автоматически. Запись хроматограммы можно остановить, нажав кнопку «Старт/Стоп».

После завершения записи хроматограммы автоматически происходит разметка всех пиков, и рассчитываются параметры пиков: время удерживания, площадь пика и его высота. Фиксируют в лабораторном журнале время выхода пика *трет*-бутилового спирта, которое в дальнейшем будут использоваться для идентификации этого вещества.

Аналогично проводят измерения для *втор*-бутилового, *изобутилового* и *н*-бутилового спиртов. На хроматограмме бутиловые спирты выходят в порядке увеличения температур кипения: *трет*-бутиловый ($T_{\text{кип}} = 82,8 \text{ }^{\circ}\text{C}$), *втор*-бутиловый ($T_{\text{кип}} = 100,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$), *изобутиловый* ($T_{\text{кип}} = 108,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$), *н*-бутиловый ($T_{\text{кип}} = 117,7 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Вода на неполярных стационарных фазах удерживается гораздо слабее любого бутилового спирта и практически не регистрируется ПИД.

Проведение градуировки

Градуировку начинают с дозирования в испаритель хроматографа 0,5 мкл градуировочного раствора с концентрациями компонентов 40 мг/л, немедленно нажимая после дозирования на кнопку «Старт/Стоп» на панели хроматографа. В открывающийся автоматически паспорт на вкладке «Проба» в поле «Название пробы» вносят название пробы, например, «гр. 1, 40 мг/л» паспорт закрывают, нажимая кнопку «Заккрыть».

После окончания записи первой хроматограммы проводят следующие операции. На левой панели нажимают кнопку «Компоненты». На вкладке «Компоненты» в нижнем поле экрана появляется таблица пиков с временами их выхода. Сравнивают полученные времена выхода пиков с временами выхода бутиловых спиртов, которые были получены при идентификации. В соответствующие строки вносят названия спиртов. Обычно в таблице определяется большее количество пиков, чем следует, поэтому «ненужные» пики следует удалить. Для этого открывают вкладку «Обработка» → «Поиск пиков» → «Интегрирование» и в строке «Мин. высота, мВ» вводят число 10 и нажимают клавишу F9 (расчет), что приводит к исчезновению в таблице пиков, высота которых меньше 10 мВ. После этого на верхней панели входят в «Метод» → «Сохранить как» и в открывшем поле указывают название создаваемого метода, используя, например, краткое название выполняемой работы и свою фамилию, например, «Спирты в воде. Иванов».

Открывают Паспорт на боковой панели инструментов и во вкладке «Назначение» заменяют «Анализ» на «Градуировка». Возвращаются в таблицу компонентов (вкладка «Компоненты») и в графе концентрация указывают концентрации спиртов в градуировочном растворе. Нажимают клавишу F9 (при этом производится расчет), открывают на боковой панели вкладку «Градуировка» и убеждаются в появлении точки на градуировочном графике. Перемещаясь по списку компонентов в таблице, можно видеть градуировочные зависимости для всех компонентов.

Проводят повторное дозирование первого градуировочного раствора, нажимая кнопку «Старт» на панели хроматографа. В открывающемся с началом записи хроматограммы окне «Паспорт хроматограммы» нажимают клавишу «Как предыдущая», находящуюся внизу. При этом автоматически заполняются поля паспорта как на

предыдущей хроматограмме. После завершения записи хроматограммы нажимают на верхней панели инструментов вкладку «Метод» → «Обработать по методу» и указывают название созданного на предыдущем этапе метода. При этом происходит разметка пиков и расчет их параметров так же, как и на предыдущей хроматограмме. Открывают Паспорт на боковой панели инструментов и во вкладке «Назначение» заменяют «Анализ» на «Градуировка». Возвращаются в таблицу компонентов (вкладка «Компоненты») и в графе концентрация указывают концентрации бутиловых спиртов в градуировочном растворе. Нажимают клавишу F9 (при этом производится расчет), открывают на боковой панели вкладку «Градуировка» и убеждаются в появлении точки на градуировочном графике.

Аналогично проводят дозирование и обработку полученных данных для других градуировочных растворов, выполняя не менее трех параллельных определений для каждого из них. При необходимости с помощью вкладки «Редактор градуировки» на верхней панели проводят отбраковку точек на градуировочной зависимости.

После обработки последней хроматограммы и получения удовлетворительного градуировочного графика (коэффициент корреляции больше 0,99) необходимо сохранить полученные результаты: «Метод» → «Сохранить как» присвоив созданному методу его прежнее название. На этом процесс градуировки завершается.

Определение концентрации бутиловых спиртов в растворе

Получают раствор у преподавателя. С помощью микрошприца отбирают 0,5 мкл раствора и вводят его в испаритель хроматографа, незамедлительно нажав на кнопку «Старт». В открывшем окне паспорта хроматограммы в названии указывают «Задача» и свою фамилию. В строке меню «Назначение» при необходимости указывают «анализ». По окончании записи хроматограммы переходят в меню «Метод» → «Обработать по методу» и указывают название созданного метода. Проводят расчет результата параллельного определения, нажав на F9. Во вкладке «Результат» в таблице отображаются идентифицированные бутиловые спирты и их концентрации. Проводят три параллельных определения спиртов в растворе. Полученные результаты заносят в табл. 4.

В качестве результата анализа принимают среднее арифметическое значение результатов параллельных определений. Рассчитывают стандартное отклонение (S) и доверительный интервал (ε) по формулам:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$\varepsilon = \pm \frac{t_{p,t} S}{\sqrt{n}},$$

где x_i и \bar{X} – результаты параллельных определений и результат анализа, соответственно; n – число параллельных определений; t – значение коэффициента Стьюдента (при $P=0,95$).

Таблица 4. Результаты определения бутиловых спиртов в растворе ($n=3$, $P=0,95$).

| Аналит | Результаты параллельных определений, мг/л | | | S, мг/л | ϵ , мг/л |
|----------------------|---|--|--|---------|-------------------|
| | | | | | |
| Трет-бутиловый спирт | | | | | |
| Втор-бутиловый спирт | | | | | |
| Изобутиловый спирт | | | | | |
| н-бутиловый спирт | | | | | |

Подготовка отчета

Отчет должен содержать (помимо общих требований):

- блок-схему хроматографа;
- крупномасштабный градуировочный график и характеристики градуировочного графика: уравнение, коэффициент корреляции, диапазон определяемых концентраций;
- результаты анализа в форме табл. 4.

Работа 2. Определение следовых концентраций метанола в этиловом спирте методом капиллярной газожидкостной хроматографии

В настоящее время капиллярная газожидкостная хроматография широко применяется для анализа пищевых продуктов. В частности, газовая хроматография является практически единственным аналитическим методом, позволяющим достаточно быстро и точно определять микроконцентрации токсичных летучих органических соединений в пищевом сырье и в спиртных напитках. Такие соединения как алифатические спирты (метанол и другие), кетоны и альдегиды неизбежно присутствуют в конечных продуктах, даже при безупречном технологическом производстве и многократной очистке сырья. Этиловый ректификованный спирт, полученный из пищевого сырья (зерно, картофель, свекла и др.), широко применяется для производства различных спиртных напитков. Одним из строго нормируемых показателей качества

этилового ректифицированного спирта является содержание в нем метанола. В соответствии с ГОСТ 5962 предельно допустимые концентрации метанола в этиловом спирте из пищевого сырья зависят от степени его очистки и находятся в диапазоне от 0,003 до 0,05 % (объемная доля). Для определения метанола в этиловом спирте применяется метод капиллярной газожидкостной хроматография с пламенно-ионизационным детектированием.

Используемые средства измерений, оборудование и реактивы

- лабораторный газовый хроматограф Хроматэк Кристалл 5000.2 с пламенно-ионизационным детектором;
- микрошприц вместимостью 10 мкл;
- кварцевая капиллярная колонка длиной не менее 10 м с неполярной (полиметилсилоксановой) стационарной жидкой фазой, например, ВРХ-1;
- градуировочные растворы с концентрациями метанола 20, 50 и 100 мг/л, приготовленные путем разбавления материала стандартного образца состава раствора метанола (ГСО 8461-2003, концентрация метанола 1,0 г/л) дистиллированной водой.

Подготовка к работе

Перед проведением градуировки студенты в присутствии преподавателя или инженера знакомятся с устройством хроматографа и микрошприца, овладевают техникой дозирования жидких проб в испаритель газового хроматографа.

При выполнении работы необходимо выполнять следующие правила:

- перед введением пробы в испаритель хроматографа необходимо, чтобы на панели хроматографа светился зеленый индикатор «Готовность»;
- при смене анализируемого раствора шприц не менее 5 раз промывают раствором, который собираются вводить;
- перед введением пробы в испаритель хроматографа необходимо тщательно протереть иглу микрошприца кусочком фильтровальной бумаги.

Условия хроматографического анализа

Температура испарителя – 130 °С, температура детектора – 200 °С, расход водорода – (20-25) мл/мин, расход воздуха – (200-250) мл/мин, температура термостата колонок – 60 °С, линейная скорость газа-носителя (азота) – (15-25) см/с, деление потока – 1/3.

Идентификация метанола

В испаритель газового хроматографа вводят 1 мкл водного раствора метанола с концентрацией 50 мг/л, немедленно после дозирования нажимая на кнопку «Старт/Стоп» на панели хроматографа. После нажатия этой кнопки начинается запись хроматограммы, отображаемая на мониторе компьютера. Если этого не происходит, нажимают стрелку →

(вправо) на верхней панели инструментов. В открывающемся автоматически паспорте хроматограммы на вкладке «Проба» в поле «Название пробы» пишут «р-р метанола 50 мг/л», после чего паспорт закрывают, нажав кнопку «Ок». Запись хроматограммы завершают через 2 мин, нажав кнопку «Старт/Стоп». После завершения записи хроматограммы автоматически происходит разметка всех пиков, и рассчитываются параметры пиков: время удерживания, площадь пика и высота. Записывают в лабораторном журнале время выхода самого большого на хроматограмме пика метанола. Это время в дальнейшем используют для идентификации метанола. Повторяют ещё дважды измерения времени удерживания метанола. Вода на неполярных стационарных фазах удерживается гораздо слабее любого спирта и практически не регистрируется ПИД.

Проведение градуировки

Градуировку начинают с дозирования в испаритель хроматографа 1 мкл первого градуировочного раствора с концентрацией метанола 20 мг/л. Сразу после дозирования нажимают на кнопку «Старт/Стоп» на панели хроматографа. Открывающийся автоматически паспорт закрывают, нажимая «ОК». После окончания записи первой градуировочной хроматограммы проводят следующие операции.

На левой панели нажимают кнопку «Создать компоненты», во всплывающем окне («Сгенерировать компоненты по неидентифицированным пикам?») нажимают «Да». На вкладке «Компоненты» в нижнем поле экрана появляется таблица пиков с временами их выхода. Сравнивают полученные времена выхода пиков со временем выхода метанола, которое было получено при идентификации. Если в таблице определилось большее количество пиков, чем следует, то «ненужные» пики следует удалить, для чего правой кнопкой мыши выделяют строчку «ненужного» пика в таблице и во всплывающем окне нажимают «Удалить запись». Для оставшегося пика метанола необходимо ввести его название и концентрацию. Для этого устанавливают курсор в поле «Название» соответствующего пика и нажимают левой кнопкой мыши. В активизированной строчке вводят название «метанол». Аналогичным образом вводят концентрацию и единицы концентрации в соответствующих столбцах данной таблицы.

Открывают паспорт хроматограммы (Хроматограмма → Паспорт) и во вкладке «Общее» изменяют «Назначение хроматограммы» на «Градуировка». В поле «Метод» вводят уникальное название (например, свою фамилию) – с этого момента начнется создание метода обработки хроматограмм, по которому будет производиться определение концентрации в пробе. Во вкладке «Проба» в поле «Название пробы» пишут «град1», что означает градуировочный раствор № 1. После данных изменений проводят перерасчет

хроматограммы, нажимая на кнопку F9. После выполнения указанных действий можно увидеть первую точку на градуировочном графике, нажав на кнопку «fx» на левой панели.

Проводят ещё дважды дозирование градуировочного раствора № 1, нажимая кнопку «Старт» на панели хроматографа. В открывающемся с началом записи хроматограммы окне «Паспорт хроматограммы» нажимают клавишу «Предыдущая», находящуюся внизу, затем «Ок». При этом автоматически заполняются поля паспорта как на предыдущей хроматограмме. После завершения записи хроматограммы нажимают «Хроматограмма» → «Обработать как предыдущую хроматограмму». При этом происходит разметка пиков и расчет их параметров так же, как и на предыдущей хроматограмме. Проверяют положение полученных точек на графике.

Проводят дозирование градуировочного раствора № 2 (50 мг/л), нажимая кнопку «Старт» на панели хроматографа. В открывающемся окне «Паспорт хроматограммы» нажимают «Предыдущая», затем «Ок». При этом автоматически заполняются поля паспорта как на предыдущей хроматограмме. Во вкладке «Проба» в поле «Название пробы» записывают «град2». По завершении записи хроматограммы нажимают «Хроматограмма» → «Обработать как предыдущую хроматограмму». Поскольку предыдущая хроматограмма снималась для раствора 20 мг/л, следует исправить концентрации для текущей хроматограммы. Для этого во вкладке «Компоненты» в нижнем поле экрана в столбец «Концентрация» вводят значение концентрации метанола в градуировочном растворе № 2 (50 мг/л). Затем проводят перерасчет хроматограммы, нажимая кнопку F9. После это можно увидеть точку на градуировочном графике, соответствующую градуировочному раствору № 2, нажав на левой панели программы кнопку «fx». Аналогично проводят ещё дважды дозирование градуировочного раствора № 2 и трехкратное дозирование градуировочного раствора № 3.

После обработки последней градуировочной хроматограммы и получения удовлетворительного градуировочного графика необходимо открыть паспорт этой хроматограммы и поставить галочку в окошке «Метод». Таким образом, в программе обработки хроматограмм появляется новый метод с названием, которое вводилось в поле «Метод» паспорта. На этом процесс градуировки завершается.

Определение концентрации метанола в этиловом спирте

Получают у преподавателя 1 мл пробы этилового спирта. Отбирают с помощью чистого микрошприца 1 мкл пробы и вводят его в испаритель хроматографа, незамедлительно нажав на кнопку «Старт». В открывшем окне «Паспорт хроматограммы» во вкладке «Общие» в меню «Назначение хроматограммы» указывают «Количественный анализ», а во вкладке «Проба» – «Проба №...». В поле «Оператор» ставят свою фамилию.

Хроматограмма при анализе пробы состоит из 3-4 небольших пиков, которые выходят до большого пика этанола. Один из этих пиков, время удерживания которого совпадает со временем удерживания метанола при градуировке, обчисляется с помощью созданной при градуировке программы с выдачей результатов параллельных определений в единицах массовой концентрации. Для того, чтобы программа выполнила расчет среднего значения концентрации из n параллельных измерений, необходимо отследить, чтобы эти измерения относились к одной группе (см. «Паспорт» → вкладка «Общее», поле «Номер»), а номера хроматограмм этих измерений имели последовательные значения от 1 до n. После окончания записи хроматограммы необходимо выбрать строчку «Обработка по методу» в меню «Хроматограмма», в диалоговом окне выбрать метод со своей фамилией, после чего выполнить расчет, нажав F9. Во вкладке «Результаты расчета» в нижнем поле экрана отображается идентифицированный метанол и его концентрация, во вкладке «Результат расчета средних» – соответственно, средние значения концентраций из n параллельных измерений. Проводят три параллельных определения метанола в пробе. Рассчитывают объемную долю метанола в пробе (принимают плотность метанола 0,792 г/мл). Полученные результаты заносят в табл. 5.

В качестве результата анализа принимают среднее арифметическое значение результатов параллельных определений. Рассчитывают стандартное отклонение (S) и доверительный интервал (ε) по формулам:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$\varepsilon = \pm \frac{t_{P,t} S}{\sqrt{n}},$$

где x_i и \bar{x} – результаты параллельных определений и результат анализа, соответственно; n – число параллельных определений; t – значение коэффициента Стьюдента (при P=0,95).

Таблица 5. Результаты определения метанола в этиловом спирте (n=3, P=0,95).

| Проба | Результаты параллельных определений, % (объемная доля) | | | Результат анализа, % (объемная доля) | S, % (объемная доля) | ε , % (объемная доля) |
|-------|--|--|--|--------------------------------------|----------------------|-----------------------------------|
| | | | | | | |

Подготовка отчета

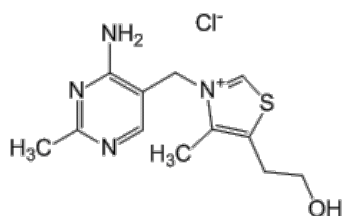
Отчет должен содержать (помимо общих требований):

- блок-схему хроматографа;
- крупномасштабный градуировочный график и характеристики градуировочного графика: уравнение, коэффициент корреляции, диапазон определяемых концентраций;
- результаты анализа в форме табл. 5.

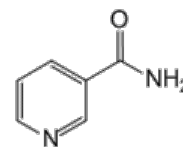
Работа 3. Определение витаминов в витаминно-минеральных комплексах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Метод ВЭЖХ-УФ находит широкое применение для контроля качества лекарственных препаратов с целью обеспечения эффективности и безопасности выпускаемой продукции. Сложный и многокомпонентный состав лекарственных препаратов требуют включения в общую схему анализа стадий пробоподготовки. Как правило, при анализе твердофазных лекарственных препаратов пробоподготовка включает растворение пробы и/или извлечение целевых аналитов из твердофазной пробы в жидкую фазу (экстрагент). Для ускорения процесса массопереноса пробу измельчают, а смесь с экстрагентом перемешивают, нагревают или создают условия для смещения равновесия экстракционного процесса. Кроме того, повысить эффективность извлечения можно с помощью ультразвукового поля. В среде распространения звуковых волн наблюдается чередование зон сжатия и разрежения, при этом в колебательное движение вовлекаются и экстрагент, и частицы пробы. Также появляются сильные турбулентные течения, которые способствуют растворению и извлечению веществ.

В данной работе выполняется определение водорастворимых витаминов (тиамина и никотинамида) в витаминно-минеральных комплексах методом обращенно-фазовой ВЭЖХ-УФ с предварительным их извлечением в водную фазу в среде ультразвукового поля. Для разделения аналитов на хроматографической колонке с октадецилсиликагелем (неполярная стационарная фаза) в качестве подвижной фазы применяют водный раствор фосфорной кислоты с добавкой ацетонитрила. Кислая среда подвижной фазы обеспечивает условия для образования молекулярных форм аналитов, которые удерживаются на неполярной стационарной фазе (октадецилсиликагель) в процессе хроматографического разделения. Структурные формулы витаминов представлены ниже:



Тиамин



Никотинамид

Используемые средства измерений, оборудование и реактивы

- хроматограф ионный «Shimadzu LC-20» со спектрофотометрическим детектором;
- весы лабораторные первого класса точности с ценой деления 0,1 мг, с наибольшим пределом взвешивания 210 г;
- мерные колбы вместимостью 25 мл;
- мерная колба вместимостью 100 мл;
- дозаторы с одноразовыми наконечниками;
- хроматографический шприц вместимостью 100 мкл;
- колонка хроматографическая «Luna» (длина 250 мм, внутренний диаметр 4,6 мм) с сорбентом C₁₈ (октадецилсиликагель), средний размер частиц 5 мкм;
- шприц вместимостью 5 или 10 мл;
- ступка фарфоровая с пестиком;
- УЗ-ванна;
- шприцевые фильтры для хроматографии;
- стеклянные стаканчики;
- шпатель;
- стандартный раствор тиамин с концентрацией 200 мг/л;
- стандартный раствор никотинамида с концентрацией 200 мг/л;
- деионизованная вода;
- элюент: H₃PO₄ (0,6 %)/ацетонитрил 99/1

Подготовка к работе

Перед проведением градуировки студенты в присутствии преподавателя или инженера знакомятся с устройством системы ВЭЖХ-УФ и микрошприца, овладевают техникой дозирования жидких проб в систему ВЭЖХ-УФ.

При выполнении работы необходимо выполнять следующие правила:

- при смене анализируемого раствора шприц не менее 5 раз промывают деионизованной водой и не менее 5 раз раствором, который собираются вводить;

- перед введением пробы в систему ВЭЖХ-УФ необходимо тщательно протереть иглу микрошприца кусочком фильтровальной бумаги.

Условия хроматографического анализа

Расход элюента – 0,75 мл/мин, температура термостата колонок – 45 °С, длина волны детектора – 254 нм, время анализа – 10 мин.

Проведение градуировки

В колбе вместимостью 25 мл готовят раствор тиамин с концентрацией 8,0 мг/л путем разбавления стандартного раствора аналита (200 мг/л) деионизованной водой. Проводят хроматографический анализ приготовленного раствора и определяют время удерживания тиамин с целью его последующей идентификации в смеси. Повторяют те же действия для никотинамида.

В колбах вместимостью 25 мл готовят градуировочные растворы смеси никотинамида и тиамин с концентрациями 0,8; 8,0 и 20,0 мг/л путем разбавления стандартных растворов аналитов (200 мг/л) деионизованной водой. Проводят хроматографический анализ приготовленных градуировочных растворов начиная с минимальной концентрации. Определяют время удерживания аналитов и площади хроматографических пиков. Данные вносят в Excel для построения градуировочных зависимостей (площадь хроматографического пика от массовой концентрации аналита в растворе).

Определение витаминов в пробе

Таблетку витаминно-минерального комплекса взвешивают в стаканчике на аналитических весах, переносят ее в фарфоровую ступку и тщательно растирают до получения однородного порошка. Затем с помощью шпателя отбирают $(0,0500 \pm 0,0005)$ г полученного порошка в стаканчик и добавляют к нему 30 мл деионизованной воды. Стакан с полученным содержимым помещают в УЗ-ванну и подвергают ультразвуковой обработке в течение 30 мин для извлечения водорастворимых витаминов.

Полученный раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят до метки деионизованной водой и тщательно перемешивают. С помощью шприца пропускают 2 мл раствора пробы через шприцевой фильтр для хроматографии. Проводят 3 параллельных определения аналитов в фильтрате. Полученные результаты заносят в табл. 6.

В качестве результата анализа принимают среднее арифметическое значение результатов параллельных определений. Рассчитывают стандартное отклонение (S) и доверительный интервал (ε) по формулам:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$\varepsilon = \pm \frac{t_{P,t} S}{\sqrt{n}},$$

где x_i и \bar{x} – результаты параллельных определений и результат анализа, соответственно; n – число параллельных определений; t – значение коэффициента Стьюдента (при P=0,95).

Таблица 6. Результаты определения тиамин и никотинамида в витаминно-минеральном комплексе (n=3, P=0,95).

| Аналит | Результаты параллельных определений, мг в таблетке | | | Результат анализа, мг в таблетке | S, мг | ε , мг |
|-------------|--|--|--|----------------------------------|-------|--------------------|
| Тиамин | | | | | | |
| Никотинамид | | | | | | |

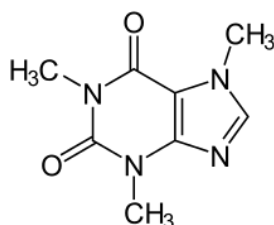
Подготовка отчета

Отчет должен содержать (помимо общих требований):

- блок-схему хроматографа;
- крупномасштабный градуировочный график и характеристики градуировочного графика: уравнение, коэффициент корреляции, диапазон определяемых концентраций;
- результаты анализа в форме табл. 6.

Работа 4. Определение содержания кофеина в чае методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Кофеин (1,3,7-триметилксантин) – алкалоид пуринового ряда, который в водных растворах обладает свойствами слабого основания (pKa 10,4 при 40 °C). Структурная формула кофеина представлена ниже:



Известно, что стимулирующее действие чая во многом определяется наличием в нем кофеина. Для определения кофеина в чае наиболее часто используют метод ВЭЖХ-УФ после извлечения аналита в водную фазу. Для увеличения эффективности извлечения кофеина из сложных по составу матриц чая применяют УЗ-поле. Ультразвук обеспечивает более глубокое проникновение растворителя в структуру пробы, обеспечивает более высокую воспроизводимость результатов извлечения аналита, увеличивает скорость массопереноса.

Используемые средства измерений, оборудование и реактивы

- хроматограф ионный «Shimadzu LC-20» со спектрофотометрическим детектором;
- весы лабораторные первого класса точности с ценой деления 0,1 мг, с наибольшим пределом взвешивания 210 г;
- мерные колбы вместимостью 50 мл;
- дозаторы с одноразовыми наконечниками;
- хроматографический шприц вместимостью 100 мкл;
- колонка хроматографическая «Luna» (длина 250 мм, внутренний диаметр 4,6 мм) с сорбентом C₁₈ (октадецилсиликагель), средний размер частиц 5 мкм;
- шприц вместимостью 5 или 10 мл;
- ступка фарфоровая с пестиком;
- УЗ-ванна;
- шприцевые фильтры для хроматографии;
- стеклянные стаканчики;
- шпатель;
- бумажный фильтр (красная лента);
- стеклянная воронка;
- стандартный раствор кофеина с концентрацией 100 мг/л;
- деионизованная вода;
- элюент: ацетонитрил – 0,1% H₃PO₄ (pH 3,5) в соотношении 10:90.

Подготовка к работе

Перед проведением градуировки студенты в присутствии преподавателя или инженера знакомятся с устройством системы ВЭЖХ-УФ микрошприца, овладевают техникой дозирования жидких проб в систему ВЭЖХ-УФ.

При выполнении работы необходимо выполнять следующие правила:

- при смене анализируемого раствора шприц не менее 5 раз промывают деионизованной водой и не менее 5 раз раствором, который собираются вводить;
- перед введением пробы в систему ВЭЖХ-УФ необходимо тщательно протереть иглу микрошприца кусочком фильтровальной бумаги.

Условия хроматографического анализа

Расход элюента – 0,5 мл/мин, температура термостата колонок – 45 °С, длина волны детектора – 280 нм, время анализа – 10 мин.

Проведение градуировки

В шесть мерных колб вместимостью 50 мл помещают 0,5; 2,5; 5,0; 7,5; и 10 мл 100 мг/л раствора кофеина, доводят объемы растворов до метки деионизованной водой и тщательно перемешивают. Проводят хроматографический анализ приготовленных градуировочных растворов начиная с минимальной концентрации. Определяют время удерживания аналита и площади хроматографических пиков. Данные вносят в Excel для построения градуировочных зависимостей (площадь хроматографического пика от массовой концентрации аналита).

Определение кофеина в чае

Методом квартования сокращают аналитическую пробу чая и отбирают навеску массой $(0,50 \pm 0,05)$ г в химический стаканчик. К пробе добавляют 10 мл деионизованной воды, смесь помещают в УЗ-ванну и проводят экстрагирование при 50 °С в течение 15 мин. Полученную смесь охлаждают и переносят в воронку с бумажным фильтром (красная лента), фильтрат собирают в мерную колбу вместимостью 50 мл. Промывают последовательно стаканчик и содержимое воронки 3 порциями деионизованной воды по 10 мл. Доводят объем раствора в колбе деионизованной водой и тщательно перемешивают.

Далее 5 мл раствора пробы фильтруют через шприцевой фильтр для хроматографии и 2 мл фильтрата переносят в колбу вместимостью 50 мл и снова доводят до метки деионизованной водой.

Полученный раствор вводят в дозирующее устройство хроматографа с помощью хроматографического шприца вместимостью 100 мкл. Объем инжестируемой пробы – 20 мкл. Проводят три параллельных определения кофеина в экстракте. Рассчитывают

значения массовой доли кофеина в чае, млн^{-1} (мкг/г). Полученные результаты заносят в табл. 7.

В качестве результата анализа принимают среднее арифметическое значение результатов параллельных определений. Рассчитывают стандартное отклонение (S) и доверительный интервал (ε) по формулам:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$\varepsilon = \pm \frac{t_{P,t} S}{\sqrt{n}},$$

где x_i и \bar{x} – результаты параллельных определений и результат анализа, соответственно; n – число параллельных определений; t – значение коэффициента Стьюдента (при $P=0,95$).

Таблица 7. Результаты определения кофеина в чае ($n=3$, $P=0,95$).

| Проба | Результаты параллельных определений, млн^{-1} (мкг/г) | | | Результат анализа, млн^{-1} (мкг/г) | S, % млн^{-1} (мкг/г) | ε , млн^{-1} (мкг/г) |
|-------|--|--|--|--|--------------------------------|---|
| | | | | | | |

Подготовка отчета

Отчет должен содержать (помимо общих требований):

- блок-схему хроматографа;
- крупномасштабный градуировочный график и характеристики градуировочного графика: уравнение, коэффициент корреляции, диапазон определяемых концентраций;
- результаты анализа в форме табл. 7.

Работа 5. Определение анионов в водных растворах методом ионной хроматографии

Ионная хроматография – аналитический вариант высокоэффективной ионообменной хроматографии на ионитах с низкой полной обменной емкостью. В качестве ионообменников для определения анионов применяют полимерные смолы, которые являются сополимерами стирола и дивинилбензола с привитыми функциональными группами.

Благодаря низкой обменной ёмкости используемых ионитов становится возможным разделение ионов при применении подвижной водной фазы с относительно низкими концентрациями элюирующих ионов. Параметры удерживания ионов в ионной хроматографии зависят от величины их заряда и радиуса. С увеличением заряда и радиуса ионов происходит увеличение их удерживания. При уменьшении размера иона увеличивается плотность электрического заряда на ионе, и, как следствие, увеличивается энергия взаимодействия иона с молекулами воды, что приводит к уменьшению коэффициента распределения иона между фазой ионита и жидкой фазой. Таким образом, порядок выхода (увеличение параметров удерживания) наиболее распространенных неорганических анионов в ионной хроматографии будет следующим:



Универсальным высокочувствительным детектором в ионной хроматографии является детектор по электропроводности (ДЭП) – кондуктометр. Сигнал ДЭП по отношению к определяемым ионам будет тем больше, чем меньше фоновая электропроводность элюента. Поскольку электропроводность воды, угольной кислоты и других слабых кислот, и оснований достаточно мала, детектирование на их фоне позволяет на 1-2 порядка снизить пределы обнаружения по сравнению с растворами сильных электролитов с той же концентрацией. Этот принцип детектирования реализуется в двухколоночном варианте ионной хроматографии. В этом варианте зоны разделяемых ионов в потоке элюента поступают во вторую, так называемую подавительную колонку с ионитом большой ёмкости, где происходит обмен катионов или анионов сильного электролита, соответственно на ионы водорода или ионы гидроксила. В частности, при использовании гидрокарбонатно-карбонатного элюента, используемого для разделения анионов, в подавительной колонке, заполненной катионитом с большой обменной ёмкостью и находящимся в H^+ -форме, происходит обмен ионов натрия, переходящих из раствора в фазу ионита, на ионы водорода, поступающие в раствор. В результате детектирование происходит на фоне раствора слабой угольной кислоты, имеющего многократно более низкую электропроводность, чем исходный гидрокарбонатно-карбонатный элюент.

Используемые средства измерений, оборудование и реактивы

- хроматограф ионный «Стайер А» с кондуктометрическим детектором;
- мерные колбы вместимостью 50 мл;
- колонка из нержавеющей стали (длина 100 мм, внутренний диаметр 4,6 мм) с сильноосновным анионитом STAR-ION, средний размер частиц 5 мкм;
- шприц вместимостью 5 или 10 мл;

- градуировочные растворы хлорид-, бромид-, нитрат-, фосфат-, сульфат-ионов с концентрациями анионов 1, 4, 10 мг/л;
- деионизованная вода;
- элюент: 1,7 ммоль/л NaHCO_3 + 1,8 ммоль/л Na_2CO_3 .

Подготовка к работе

Перед проведением градуировки студенты в присутствии преподавателя или инженера знакомятся с устройством ионного хроматографа.

Условия хроматографического анализа

Расход элюента – 1,5 мл/мин, температура разделительной колонки – комнатная, время анализа – 30 мин.

Проведение градуировки

Перед дозированием пробы в хроматограф во всех случаях переводят кран-дозатор в левое положение «LOAD» и нажимают на панели системы управления кнопку «Старт». Вводят название пробы и нажимают «ОК».

Последовательно дозируют в хроматограф и анализируют (снимают хроматограммы) по 2 раза 3 градуировочных раствора, переходя от растворов с меньшей концентрацией к более высокой. Для этого 1-2 мл градуировочного раствора отбирают в шприц, и с его помощью вводят отобранный раствор в дозирующую петлю, пропуская пятикратный объем по отношению к объему дозирующей петли. Затем переводят кран-дозатор в правое положение «INJECT». С этого момента начинается анализ – регистрация хроматограммы, которая осуществляется на голубом фоне.

После того как на хроматограмме появились пики аналитов, а анализ не завершен автоматически, его завершают, нажав кнопку «Стоп». При этом происходит автоматическая разметка пиков на хроматограмме, им присваивается условная концентрация. При выполнении градуировки необходимо открыть Таблицу компонентов (зелёная пробирка в пиктографическом меню). Первый пик на хроматограмме соответствует хлорид-иону, второй – бромид-иону, третий – нитрат-иону, далее фосфат- и сульфат-ионы. При необходимости заносят названия этих ионов в Таблицу в поле «Имя».

Если в Таблице компонентов присутствуют более трех пиков, оставляют только три наиболее крупных пика, остальные удаляют с помощью клавиши «Удалить». Далее открывают Таблицу концентраций, нажимая на кнопку «Концентрации», и добавляют в неё столбец, соответствующий первой градуировочной точке. Для этого мышкой щелкают по кнопке «Добавить». Открывается окно «Добавить точку». В первую строку вносят номер градуировочной точки (1), во вторую строку – численное значение концентрации аналитов в первом градуировочном растворе – 1. Далее ставят флажок в поле

«Градуировать сразу» и нажимают ОК. В таблице концентраций нажимают клавишу «Градуировать» и затем ОК. Если таблица концентраций уже создана, то нажимают кнопку «Градуировать» и выбирают номер заменяемой градуировочной точки. Теперь можно увидеть первую точку на градуировочном графике, если нажать на кнопку «графики» в Таблице компонентов.

Переводят кран-дозатор в левое положение «LOAD» и нажимают на панели системы управления кнопку «Старт». Вводят название пробы и нажимают «ОК». Повторно отбирают в шприц первый градуировочный раствор и прокачивают его через дозирующую петлю крана-дозатора. Затем переводят кран-дозатор в правое положение «INJECT». С этого момента начинается анализ – регистрация хроматограммы, которая осуществляется на голубом фоне. Заполняют паспорт хроматограммы. Регистрацию хроматограммы заканчивают, нажимая на кнопку «Стоп».

Повторяют указанные выше операции для остальных градуировочных растворов. В процессе градуировки создают 6 градуировочных точек – по 2 точки для каждого из 3 градуировочных растворов.

Определение концентраций анионов в растворе

Переводят кран-дозатор в левое положение «LOAD» и нажимают на панели системы управления кнопку «Старт». Вводят название пробы и нажимают «ОК». Отбирают в шприц раствор пробы, промывая его несколько раз этим раствором, и вводят его в дозирующую петлю крана-дозатора. Затем переводят кран-дозатор в правое положение «INJECT». С этого момента начинается анализ – регистрация хроматограммы, которая осуществляется на голубом фоне. Заполняют паспорт хроматограммы. Регистрацию хроматограммы заканчивают, нажимая кнопку «Стоп». Концентрации соответствующих ионов в растворе пробы автоматически записываются над их пиками на хроматограмме. Проводят 3 параллельных определения ионов в растворе. Полученные результаты заносят в табл. 8.

В качестве результата анализа принимают среднее арифметическое значение результатов параллельных определений. Рассчитывают стандартное отклонение (S) и доверительный интервал (ε) по формулам:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$
$$\varepsilon = \pm \frac{t_{p,f} S}{\sqrt{n}},$$

где x_i и \bar{X} – результаты параллельных определений и результат анализа, соответственно; n – число параллельных определений; t – значение коэффициента Стьюдента (при $P=0,95$).

Таблица 8. Результаты определения анионов в растворе ($n=3$, $P=0,95$).

| Аналит | Результаты параллельных определений, мг/л | | | Результат анализа, мг/л | S, мг/л | ε , мг/л |
|-------------|---|--|--|-------------------------|---------|----------------------|
| Хлорид-ион | | | | | | |
| Бромид-ион | | | | | | |
| Нитрат-ион | | | | | | |
| Фосфат-ион | | | | | | |
| Сульфат-ион | | | | | | |

Подготовка отчета

Отчет должен содержать (помимо общих требований):

- блок-схему хроматографа;
- крупномасштабный градуировочный график и характеристики градуировочного графика: уравнение, коэффициент корреляции, диапазон определяемых концентраций;
- результаты анализа в форме табл. 8.

Работа 6. Определение катионов методом капиллярного электрофореза

При определении катионов методом КЭ аналиты регистрируются в последовательности, которая определяется их электрофоретической подвижностью. Первыми мигрируют пики ионов аммония и калия. Их электрофоретические подвижности одинаковы, поэтому без специальных мер они выходят одним общим пиком. Для разделения ионов аммония и калия в состав фонового электролита вводят специальную добавку – 18-краун-6. В результате образуются комплексы включения по типу «гость-хозяин», где «гостем» являются катионы калия, а «хозяином» — молекулы краун-эфира, в основе такого комплексообразования лежат ион-дипольные взаимодействия катиона калия с атомами кислорода. Благодаря образованию комплекса включения подвижность ионов калия снижается, а подвижность других ионов остается без изменений. После ионов калия один за другим с хорошим разрешением мигрируют пики ионов натрия, лития, магния, стронция, бария и кальция.

Для определения неорганических катионов используют косвенное УФ-детектирование, так как они не поглощают в УФ-области спектра. В ФЭ вводят хромофор,

который поглощает при определенной длине волны (в данной работе – бензимидазол). Ионная сила электролита остается постоянной, а в зоне, где есть непоглощающий ион, уменьшается концентрация поглощающего иона, происходит эквивалентный обмен и можно наблюдать обратные пики на электрофореграмме.

Выбор ФЭ является одной из важнейших задач в КЭ. Фоновый электролит определяет скорость ЭОП, форму нахождения аналитов в капилляре, должен обладать достаточной буферной емкостью, чтобы не допустить изменения рН в процессе электролиза. Также в состав ФЭ вводят различные добавки, чтобы повысить эффективность и селективность разделения компонентов смеси. Наиболее распространенными буферными системами для КЭ являются фосфатная, цитратная, формиатная и боратная.

Используемые средства измерений, оборудование и реактивы

- прибор для КЭ с источником высокого напряжения положительной полярности, оснащенный кварцевым капилляром с эффективной длиной не менее 50 см и внутренним диаметром от 50 до 100 мкм, фотометрическим или спектрофотометрическим детектором, позволяющим проводить измерения в области длин волн от 250 до 280 нм, и компьютером со специальным программным обеспечением для регистрации и обработки электрофореграмм, например, система капиллярного электрофореза "Капель" с программным обеспечением "Эльфوران";
- стандартные образцы состава водных растворов катионов аммония, бария, калия, кальция, лития, магния, натрия, стронция с массовой концентрацией 1 г/л.
- весы лабораторные первого класса точности с ценой деления 0,1 мг, с наибольшим пределом взвешивания 210 г;
- дозаторы с одноразовыми наконечниками;
- колбы мерные вместимостью 50 и 100 мл;
- стаканы химические;
- воронки лабораторные;
- колбы конические КН-1 или КН-2;
- пробирки типа "Эппендорф";
- фильтры мембранные с порами диаметром не более 0,45 мкм;
- фильтры бумажные обеззоленные "синяя лента";
- плитка электрическая с закрытой спиралью;
- баня водяная любого типа;

- баня ультразвуковая любого типа;
- центрифуга любого типа;
- холодильник;
- деионизованная вода;
- гидроксид натрия, ч.д.а.;
- кислота соляная, х.ч.;
- кислота винная, безводная, ч.д.а.;
- кислота азотная, х.ч. или ч.д.а.;
- бензимидазол, ч., массовая доля основного вещества не менее 98%;
- 18-краун-6, массовая доля основного вещества не менее 98% (краун-эфир хранят в холодильнике при температуре от 2 до 8 °С);
- фоновый электролит: 10 ммоль/л бензимидазола, 5 ммоль/л винной кислоты, 2 ммоль/л 18-краун-6.

Приготовление градуировочных растворов

Для градуировки прибора используют градуировочные растворы, приведенные в табл. 9. Градуировочные растворы готовят путем разбавления СО состава водных растворов ионов с использованием мерных колбы и дозаторов. Для приготовления градуировочного раствора № 6 в мерную колбу вместимостью 100 мл вносят соответствующие объемы СО состава раствора ионов с массовой концентрации 1 г/л, и доводят содержимое колбы до метки деионизованной водой. Для приготовления градуировочных растворов № 1, № 2, № 3, № 4 и № 5 в пять мерных колб вместимостью 50 мл вносят соответственно 0,5; 2; 5; 10 и 20 мл градуировочного раствора № 6 и доводят до метки деионизованной водой. Срок хранения приготовленных градуировочных растворов смеси катионов в плотно закрытых емкостях из полимерных материалов в холодильнике при температуре от 2 до 8 °С составляет для растворов: № 1 и 2 не более 7 суток; № 3, 4 и 5 не более 21 суток; № 6 не более 3 месяцев.

Таблица 9. Состав градуировочных растворов.

| Катион | Массовые концентрации катионов в градуировочных растворах, мг/л | | | | | |
|---------------|--|----------|----------|----------|----------|----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Аммоний | 0,50 | 2,00 | 5,0 | 10,0 | 20,0 | 50,0 |
| Калий | 0,50 | 2,00 | 5,0 | 10,0 | 20,0 | 50,0 |
| Натрий | 0,50 | 2,00 | 5,0 | 10,0 | 20,0 | 50,0 |
| Литий | 0,02 | 0,08 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 2,0 |
| Магний | 0,25 | 1,00 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 25,0 |
| Стронций | 0,50 | 1,00 | 5,0 | 10,0 | 20,0 | 50,0 |
| Барий | 0,05 | 0,20 | 0,5 | 1,0 | 2,0 | 5,0 |
| Кальций | 0,50 | 2,00 | 5,0 | 10,0 | 20,0 | 50,0 |

Условия анализа

Внутренний диаметр капилляра – 75 мкм, Lэфф/Лобц = 50/60 см, гидродинамический ввод пробы (30 мбарх10 с), напряжение +13 кВ, температура – 20 °С, длина волны – 267 нм.

Подготовка к работе

Перед проведением градуировки студенты в присутствии преподавателя или инженера знакомятся с системой КЭ.

Все растворы, контактирующие с капилляром (промывочные, буферные и растворы пробы), перед помещением их в прибор обязательно центрифугируют (скорость вращения 5000 об/мин, время 3-5 мин).

Для промывки капилляра между анализами настоятельно рекомендуется использовать отдельную пробирку с ФЭ, при этом составы промывочного и рабочего растворов ФЭ должны быть одинаковыми.

ФЭ, участвующий в анализе, заменяется через каждые 4-5 анализов или по мере его загрязнения (в зависимости от состава анализируемых образцов). Признаки загрязнения ФЭ: появление на электрофореграмме ступеней, дрейфа базовой линии, а также изменение величины тока по сравнению с первыми анализами (не путать с небольшим (допустимым) дрейфом тока в ходе одного анализа).

В автосамплер на 10 проб загружают пробирки с растворами для промывки капилляра и для определения катионов. Промывка капилляра – автоматическая (при постоянном давлении 1000 мбар). Полное управление прибором, сбор и обработка данных выполняются с помощью специализированного программного обеспечения «Эльфран». Все процедуры – от ввода пробы до промывки капилляра производятся автоматически в режиме программирования.

Перед началом работы капилляр по программе промывки капилляра промывают 3 мин деионизованной водой, 5 мин 0,5 моль/л раствором соляной кислоты, 5 мин деионизованной водой, 5 мин 0,5 моль/л раствором гидроксида натрия, вновь 10 мин деионизованной водой, а затем ФЭ для удаления возможных оставшихся на капилляре примесных веществ.

Проведение градуировки

Для градуировки открывают программу анализа катионов. В автосамплер последовательно загружают пробирки с градуировочными растворами в ячейку № 4,

проводят по 3 параллельных измерения по программе для определения катионов, между которыми промывают капилляр деионизованной водой в течение 2 мин.

После каждого измерения в окне появляется электрофореграмма. В окне отображаются электрофореграмма, параметры и Таблица компонентов. Паспорт электрофореграммы содержит редактируемые поля: комментарий к электрофореграмме и комментарий к автосамплеру. Вкладка «Метод» содержит данные о методе обработки электрофореграммы, инструменты для проведения градуировки, кнопку открытия Отчёта. Поле «Метод», в котором указывается название выбранного Метода идентификации пиков и расчета концентрации компонентов электрофореграммы.

Открывают электрофореграмму для первой градуировочной точки. Проверяют правильность автоматической разметки, при необходимости корректируют её вручную. Сохраняют электрофореграмму. В Параметрах электрофореграммы открывают вкладку «Метод». Устанавливают галочку в окне «Градуировочная». Вводят название и концентрацию градуировочных компонентов в соответствующие поля Таблицы компонентов. Разделителем при указании численного значения концентрации является точка. Нажимают кнопку «Создать метод», в открывшемся окне вводят название Метода, нажимают «Сохранить». Открывают копию файла созданного Метода, нажав кнопку «Просмотреть». В открывшемся окне Метод устанавливают необходимые настройки во вкладке «Компоненты». Нажимают кнопку «Применить для всех», сохраняют Метод, нажав кнопку «Сохранить метод, как...» и подтвердив перезапись Метода.

Открывают следующую градуировочную электрофореграмму, проверяют правильность автоматической разметки, при необходимости корректируют её вручную. Сохраняют электрофореграмму. Переходят на вкладку «Метод» в Параметрах электрофореграммы. Устанавливают галочку «Градуировочная». Нажимают кнопку «Открыть метод», выбирают Метод (созданный для первой градуировочной точки), при этом содержимое файла Метода копируется. В Таблицу компонентов будут автоматически внесены названия компонентов с Градуировочной таблицей Метода. В столбце «Концентрация» Таблицы компонентов необходимо ввести концентрацию компонентов в градуировочном растворе. Нажимают кнопку «Добавить в метод», в открывшемся окне выбирают файл созданного метода.

После внесения в градуировочную зависимость последней точки открывают окно Метода в Главном меню программы, проверяют линейность градуировочного графика. Внесённые в Метод изменения необходимо сохранить, нажав кнопку «Сохранить метод как...».

Определение концентраций катионов в растворе

Пробирку, заполненную анализируемым раствором, помещают в левую ячейку № 4. Запускают необходимую программу измерения. После записи электрофореграммы заполняют поле «Комментарии» во вкладке «Паспорт» в разделе «Параметры электрофореграммы» (указывают название пробы). Проверяют правильность автоматической разметки. Сохраняют электрофореграмму. Открывают вкладку «Метод» в разделе Параметры, проверяют, снята ли галочка «Градуировка», если нет, снимают её, в открывшемся окне нажимают «Да».

Нажимают кнопку «Открыть», выбирают файл метода, при этом содержимое файла метода копируется. Проверяют правильность идентификации пиков компонентов. При необходимости корректируют названия пиков в Таблице компонентов. Названия компонентов изменяются в соответствии с Градуировочной таблицей Метода, при этом основанием для изменения является время выхода компонента, одновременно происходит расчёт концентрации компонентов с использованием типа градуировочной зависимости Абсолютная.

Проводят последующие параллельные определения катионов в растворе (не менее трех), обрабатывая электрофореграмму таким же образом. Полученные результаты заносят в табл. 10.

В качестве результата анализа принимают среднее арифметическое значение результатов параллельных определений. Рассчитывают стандартное отклонение (S) и доверительный интервал (ε) по формулам:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$\varepsilon = \pm \frac{t_{P,t} S}{\sqrt{n}},$$

где x_i и \bar{x} – результаты параллельных определений и результат анализа, соответственно; n – число параллельных определений; t – значение коэффициента Стьюдента (при P=0,95).

Таблица 10. Результаты определения катионов в растворе (n=3, P=0,95).

| Катион | Результаты параллельных определений, мг/л | | | Результат анализа, мг/л | S, мг/л | ε, мг/л |
|----------|---|--|--|-------------------------|---------|---------|
| | | | | | | |
| Аммоний | | | | | | |
| Калий | | | | | | |
| Натрий | | | | | | |
| Литий | | | | | | |
| Магний | | | | | | |
| Стронций | | | | | | |
| Барий | | | | | | |
| Кальций | | | | | | |

После окончания рабочего дня капилляр тщательно промывают, концы капилляра оставляют в деионизованной воде во избежание пересыхания.

Подготовка отчета

Отчет должен содержать (помимо общих требований):

- блок-схему прибора для КЭ с обозначением всех элементов и указанием их назначения;
- крупномасштабный градуировочный график и характеристики градуировочного графика: уравнение, коэффициент корреляции, диапазон определяемых концентраций;
- результаты анализа в форме табл. 10.

Список рекомендуемой литературы

1. Аналитическая химия. Методы разделения веществ и гибридные методы анализа. Учебник / Под ред. Л.Н. Москвина. – СПб: Издательство «Лань», 2019. – 332 с.
2. Москвин Л.Н., Родинков О.В. Методы разделения и концентрирования в аналитической химии. Издательский дом «Интеллект», 2012. – 352 с.
3. Высокоэффективная газовая хроматография / Под ред. К. Хайвера; Пер. с англ. М. А. Кожевник; Под ред. В. Г. Березкина. - М.: Мир, 1993. - 288 с.
4. Сычев К.С. Практическое руководство по жидкостной хроматографии / Под ред. А.А. Курганова. – «Техносфера», 2010. – 272 с.
5. Лебедев А.Т. Масс-спектрометрия для анализа объектов окружающей среды. М: Издательство «Техносфера», 2013. – 632 с.
6. Карасек Ф., Клемент Р. Введение в хромато-масс-спектрометрию. М: Издательство «Мир», 1993. – 237 с.
7. Комарова Н.В., Каменцев Я.С. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «Капель». СПб: ООО «Веда», 2006. 212 с.
8. Карцова Л.А., Бессонова Е.А. Методы он-лайн концентрирования в капиллярном электрофорезе. Учебно-методическое пособие. СПб: издательство «ВВМ». 2014. – 38 с.