**Раздел курса:** **ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ**

Лекция 41-42

**Тема лекции:** **ТЕОРИЯ ТАРЕЛОК.**

# ХРОМАТОГРАФИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ.

# КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

**План лекции:**

1. **Прогнозирование возможности разделения веществ.**
2. **Характеристики удерживания как идентификационные признаки. Другие способы опознания веществ. Понятие о хромато-масс-спектрометрии.**
3. **Аналитические сигналы в хроматографии. Расчет результатов анализа по способу абсолютной калибровки. Способ внутреннего стандарта. Способ нормализации.**

# Теория тарелок (1)

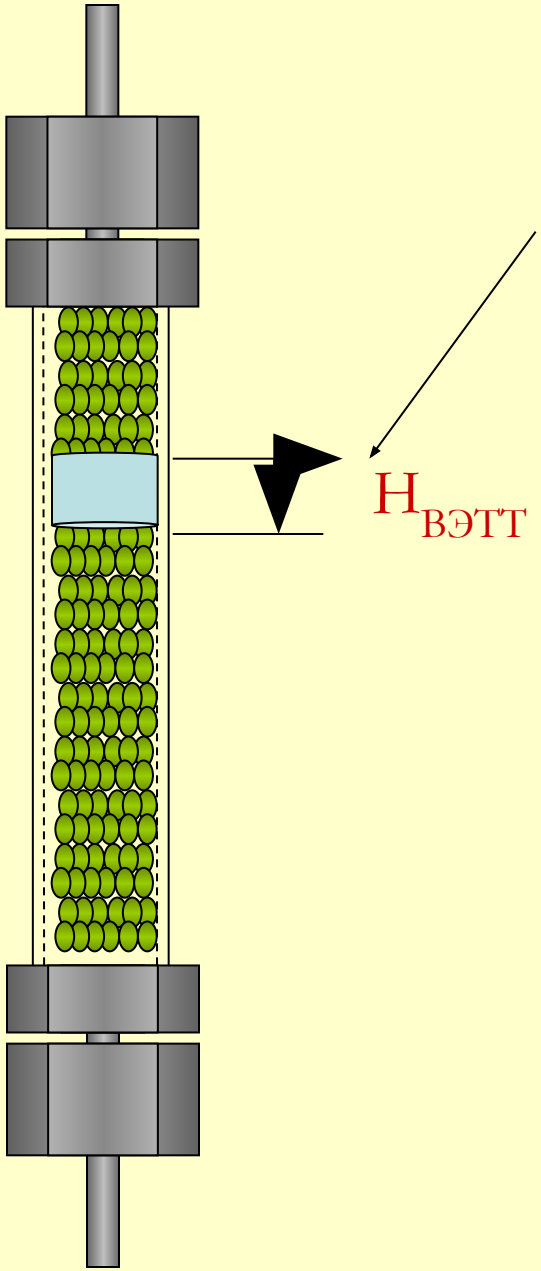
**Создана А.Мартином и Р.Синджем в конце 1940-х годов**

**Основана на линейной равновесной модели хроматографического процесса.**

**Позволяет ответить на следующие вопросы:**

- **какую форму должен иметь хроматографический пик, насколько он будет размыт при использовании данной колонки?**
- **как зависит скорость движения компонента в колонке (*И*) от коэффициента его распределения (*Г*) между ПФ и НЖФ?**
- **насколько должны различаться свойства компонентов, чтобы в данной колонке произошло их полное разделение?**
- **какой минимальной длины должна быть хроматографическая колонка, чтобы компоненты с заданными свойствами в ней разделились?**

# Теория тарелок (2)




Высота, эквивалентная теоретической тарелке.
Соответствует высоте слоя сорбента,
при прохождении которой акт сорбции—десорбции данной молекулы успевает совершиться один раз.

ВЭТТ определяется природой сорбата, качеств
сорбента, способом заполнения колонки и
условиями хроматографирования (температур
скорость газа носителя и т.п.).

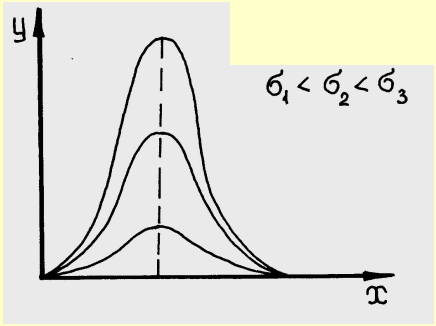
**Число тарелок (N) зависит от длины колонки.**

$$N = L / H_{ВЭТТ}$$

где L – длина колонки

# Форма хроматографического пика

Из теории тарелок следует, что форма любого хроматографического пика при линейной изотерме сорбции должна описываться функцией Гаусса (кривой нормального распределения).




$$y = \frac{1}{\sigma \cdot \sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}}$$

**σ = f (N)**

Число тарелок в колонке можно оценить эмпирически, измерив на хроматограмме время удерживания и ширину любого пика у его основания (μ) или на половине его высоты ($\mu_{0,5}$)

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{\mu}\right)^2 = 5.545 \cdot \left(\frac{t_R}{\mu_{0.5}}\right)^2$$

Пусть для некоторого пика $t_r$ = 100 и $\mu$ = 1. Значит, $N$ = 160 000 !

**Обычно на хроматограмме смеси пики тем шире, чем больше время удерживания компонента.**

**Почему?**

Для веществ одного класса данная колонка имеет приблизительно одинаковое число теоретических тарелок ($N_1 \approx N_2 \approx N_3$ ....). Это объясняет, почему при изотермическом режиме разделения пики разных веществ имеют разную ширину, прямо пропорциональную времени удерживания ($t_r$).

$$N = 16 \cdot \left( \frac{t_R}{\mu} \right)^2 \longrightarrow \left( \frac{t_{R1}}{\mu_1} \right) = \left( \frac{t_{R2}}{\mu_2} \right)$$

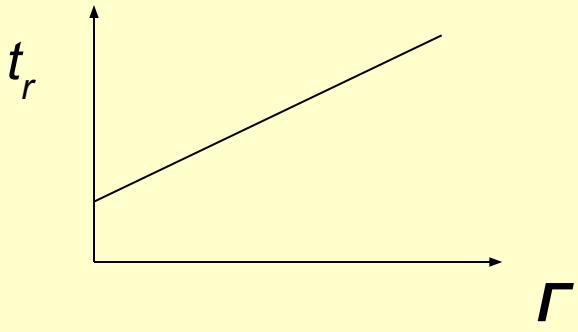
Пусть для пика 1 $tr_1$ = 100 и $\mu_1$ = 1. Если вещества 1 и 2 однотипны, $N_1 \approx N_2$. Тогда для пика 2, у которого $tr_2$ = 400, $\mu_2$ = 4

## Как связаны скорость движения компонента в колонке (*И*) и коэффициент его распределения (*Г*) между ПФ и НЖФ?

Из теории тарелок следует, что

$$w = \frac{U}{V_{ПФ} + Г \cdot V_{НЖФ}} \qquad (1),$$

*U* – скорость движения газа-носителя.

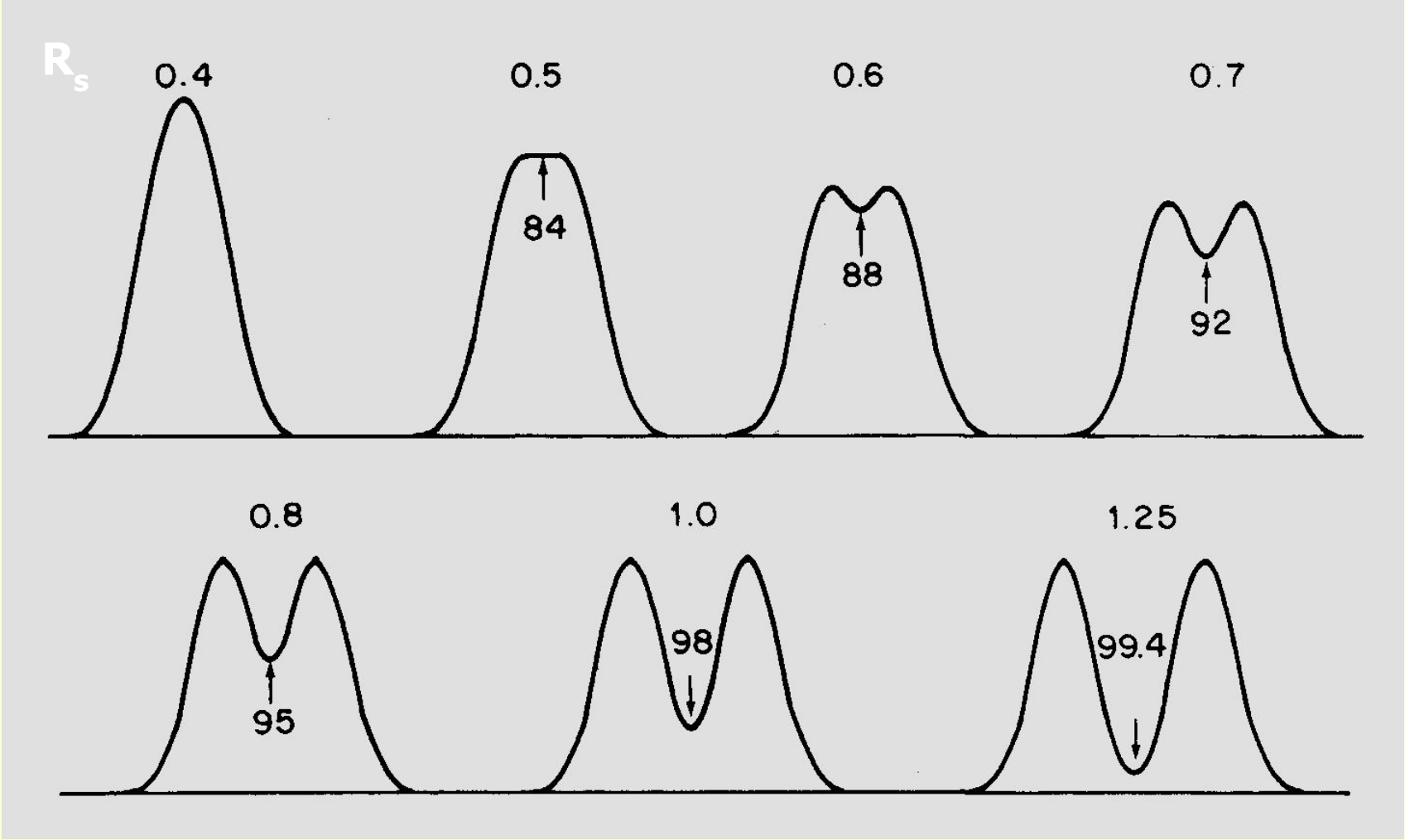



$$t_{R1} = \frac{L}{w_1} = \frac{L \cdot (V_{ПФ} + Г_1 \cdot V_{НЖФ})}{U} \qquad (2)$$

$$t_{R\ отн.} = \frac{t_{R1}}{t_{R2}} = \frac{V_{ПФ} + Г_1 \cdot V_{НЖФ}}{V_{ПФ} + Г_2 \cdot V_{НЖФ}} \qquad (3)$$

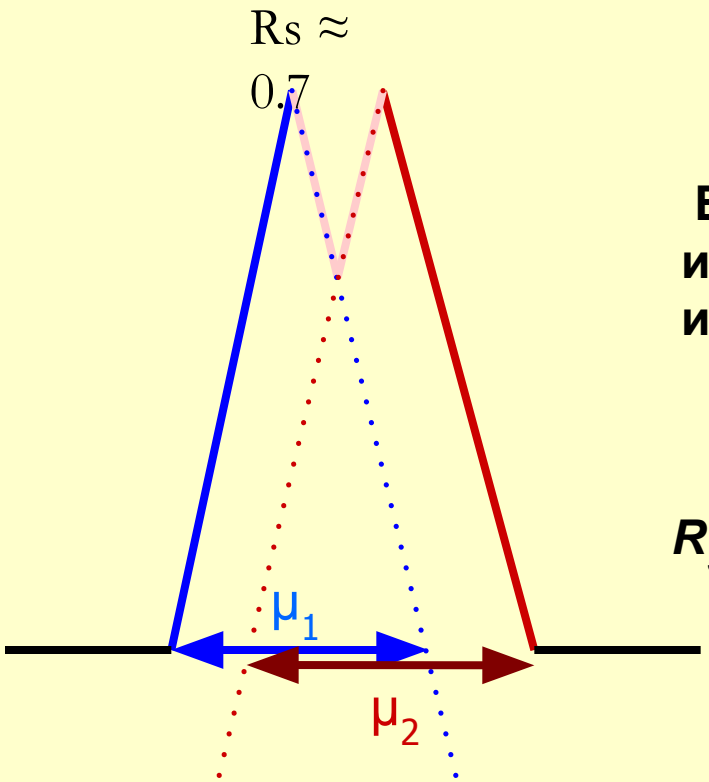
**Относительные времена удерживания не зависят от длины колонки и скорости газа-носителя !**

# Связь разрешения и перекрывания пиков




**При количественном (100%) разрешении пиков $R_s > 1.5$**

# Прогнозирование разрешения пиков




$$Rs = \frac{2 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{\mu_1 + \mu_2}$$

**Величину $R_s$ можно предсказать по известным коэффициентам распределения ($\Gamma_1$ и $\Gamma_2$) и числу тарелок в данной колонке ($N$)**

$$R_S = 0{,}424 \frac{\Gamma_2 - \Gamma_1}{\Gamma_2 + \Gamma_1} \cdot \sqrt{N} = 0{,}212 \, \Delta\Gamma \frac{\sqrt{N}}{\Gamma ср}$$

Величина $R_s$ зависит от природы компонентов, условий их разделения и характеристик колонки (эффективности и селективности)

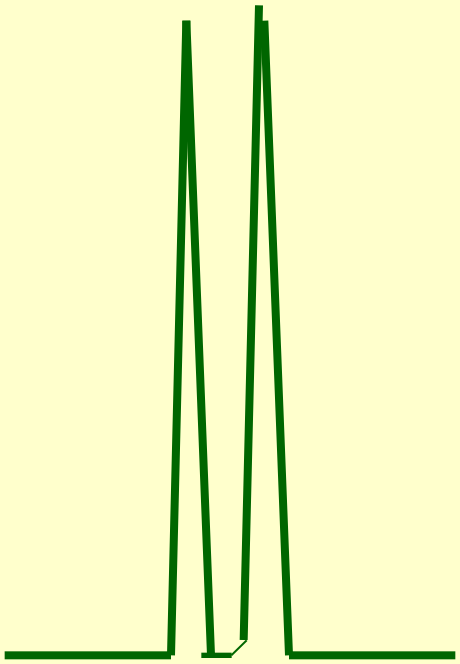
**Селективность колонки** определяется относительным различием коэффициентов распределения разделяемых веществ.

$$R_S = 0{,}212 \frac{\Delta\Gamma}{\Gamma_{ср}} \sqrt{N}$$

**Эффективность колонки** определяется числом теоретических тарелок.

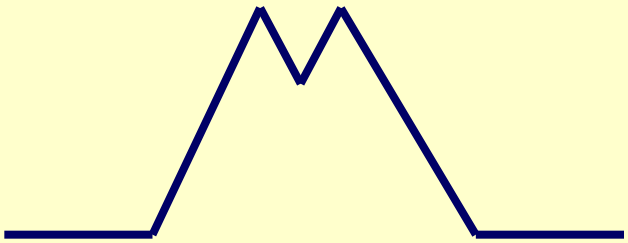
# Влияние селективности и эффективности колонки на разрешение пиков

**N = 10 000**



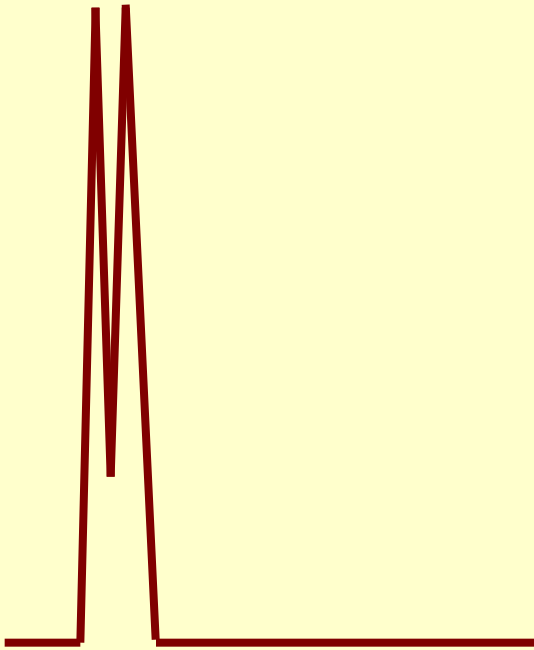
Высокая селективность, высокая эффективность

**N = 400**



Высокая селективность, низкая эффективность

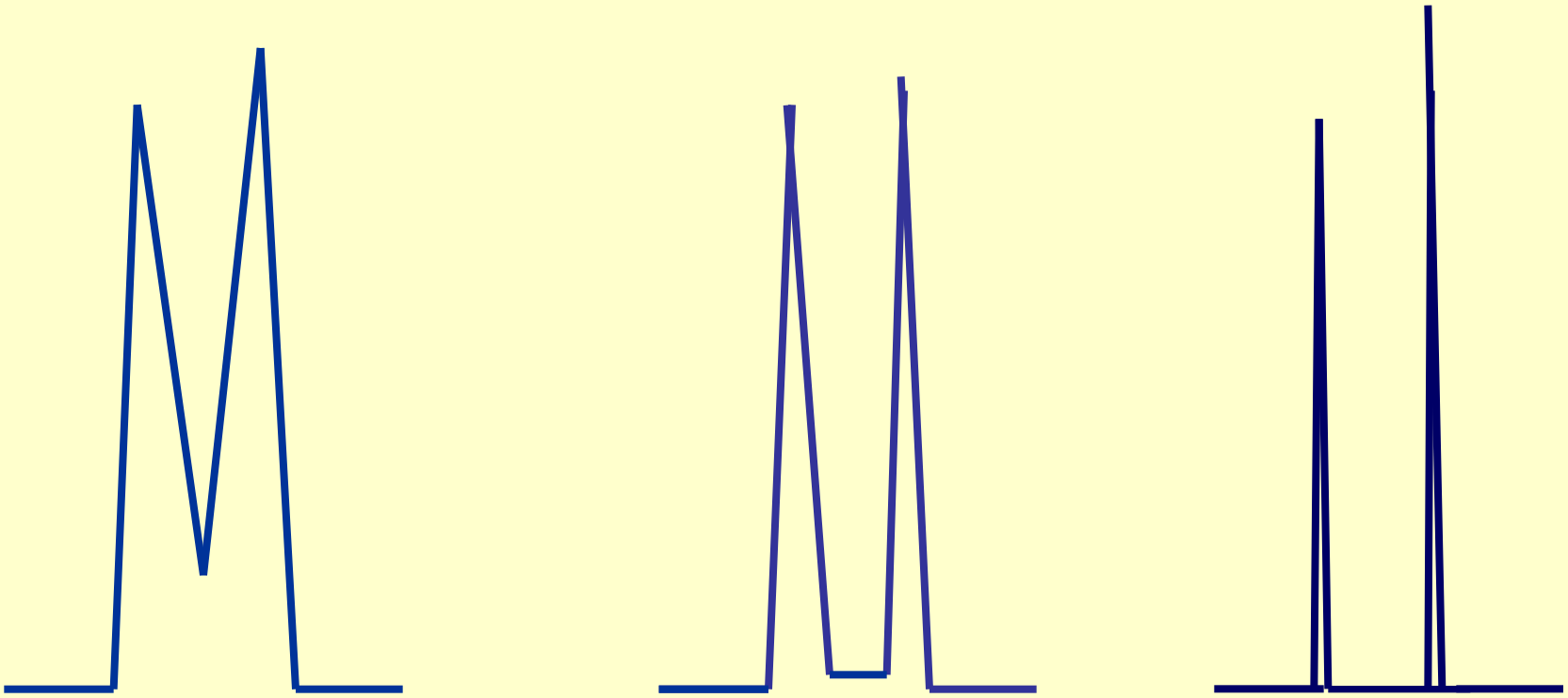
**N = 10 000**



Низкая селективность, высокая эффективность

| | |
|---|---|
| **Способы повышения селективности:** | **Замена НЖФ,**<br>**изменение температуры колонки.** |
| **Способы повышения эффективности:** | **Увеличение длины колонки (переход к капиллярным колонкам),**<br>**изменение скорости движения ПФ,**<br>**изменение температуры колонки,**<br>**замена НЖФ или носителя.** |

# Влияние длины колонки на разрешение пиков



L = 1 м

L = 5 м

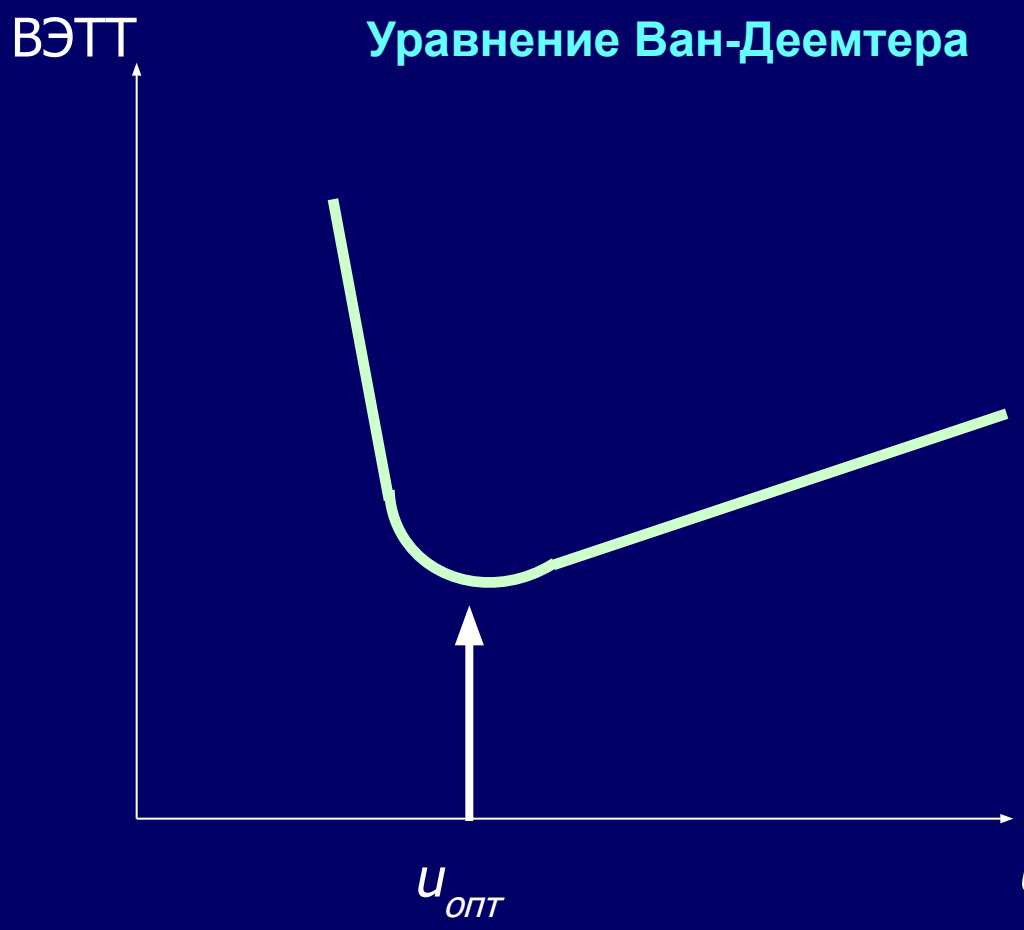
L = 25 м

**Состав смеси, природа НЖФ и условия разделения во всех случаях одинаковы**

# Влияние скорости газа-носителя на разрешение пиков

$$ВЭТТ = A + B/u + Cu$$

**Уравнение Ван-Деемтера**



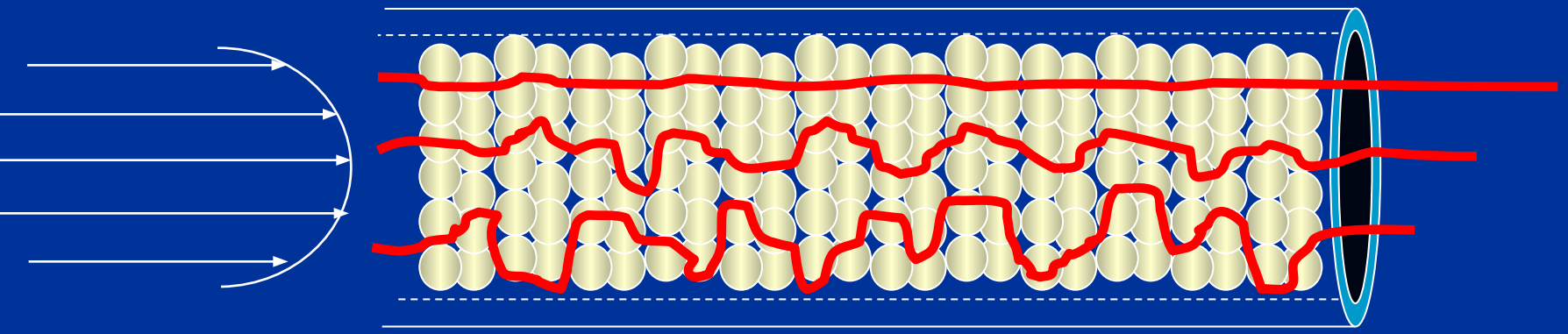

A – Вихревая диффузия

B/u – Молекулярная диффузия

Cu – Сопротивление массопереносу

# Кинетическая теория размывания

Скорость перемещения по колонке отдельных молекул отличается от средней скорости, характерной для данного соединения



**Учитываются следующие процессы:**

- неоднородность потока подвижной фазы.
- продольная диффузия в НЖФ и ПФ
- кинетика массопередачи в НЖФ и ПФ
- неравновесность процесса внутри застойных зон

# СПОСОБЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВЕЩЕСТВ
## в хроматографическом анализе

1. **По совпадению характеристик удерживания для пробы (*t*) и эталона ($t_x$), где X – предполагаемый компонент пробы.**

**При этом значения $t_x$ получают: 1) опытным путем, 2) из справочников, 3) по значениям $t_x$ структурных аналогов.**

2. **По совпадению спектра компонента пробы (после хроматографического разделения) и эталонного спектра X.**

3. **По результатам сопоставления хроматограмм пробы, полученных в разных условиях (до и после химической обработки, при разных способах детектирования и т.п.).**

# Сходимость времен и индексов удерживания толуола при анализе модельной смеси

| Режим разделения | Содержание, % | $W_t$, % | $W_I$, % |
|---|---|---|---|
| Изотермический режим | 10 | 1,6 | 0,10 |
| | 0,01 | 2,0 | 0,09 |
| | 0,001 | 4,1 | 0,45 |
| Режим программирования | 10 | 0,6 | 0,08 |
| | 0,01 | 0,6 | 0,07 |
| | 0,001 | 1,0 | 0,15 |

**Надо использовать индексы Ковача!**

# Логарифмический индекс удерживания
## *(индекс Ковача)*

$$I_x = 100\left[\frac{lg\,t'R(x) - lg\,t'R(n)}{lg\,t'R(n+1) - lg\,t'R(n)} + n\right]$$

где $t`_{R\,(n)}$ и $t`_{R\,(n+1)}$ — исправленные времена удерживания н-алканов с *n* и *n*+1 атомами углерода, выходящих из колонки до и после X, а $t`_{R\,(x)}$ - исправленное время удерживания X.

**Индекс Ковача определяется природой X и типом НЖФ, слабо зависит от температуры и практически не зависит от скорости газа-носителя, концентрации X и состава пробы.**

# Пример расчета

На хроматограмме бензина $t`_R$ некоторого пика - 189 с. Пик X лежит между пиками н-гептана и н-октана, для которых $t`_R$ равны 172 и 218 с. Предполагают, что X - это 2,2,4-триметилпентан, у которого $t`_R$ = *739,0 (* для той же НЖФ и той же температуры). Верно ли это предположение?

*Решение*. Подстановка дает:

$$I_x = 100 \left( \frac{\lg 189 - \lg 172}{\lg 218 - \lg 172} + 7 \right) = 739{,}2$$

Полученное значение $I_x$ почти не отличается от табличного *t`R* (погрешность измерения индексов обычно не превышает 0,5 единицы). Следовательно, X может быть 2,2,4-триметилпентаном.

# Пример выдачи на печать результатов работы системы компьютерной идентификации (СКИ) при хроматографическом анализе бензина

| Peak | t | I | $I_x$ | Name | % |
|---|---|---|---|---|---|
| 37 | 33,975 | 741,1 | 741,3 | 3,3 - dimethylhexane | 0,109 |
| 38 | 35,718 | 755,3 | 755,3 | Toluene | 11,066 |
| 39 | 35,944 | 756,4 | ? | unidentified | 0 ,018 |
| 40 | 36,367 | 760,6 | 760,2 | 2,3 - dimethylhexane | 0,319 |
| 41 | 36,541 | 762,0 | 762,1 | 3- ethyl - 2 - methylpentane | 0,078 |

t – время удерживания, минуты

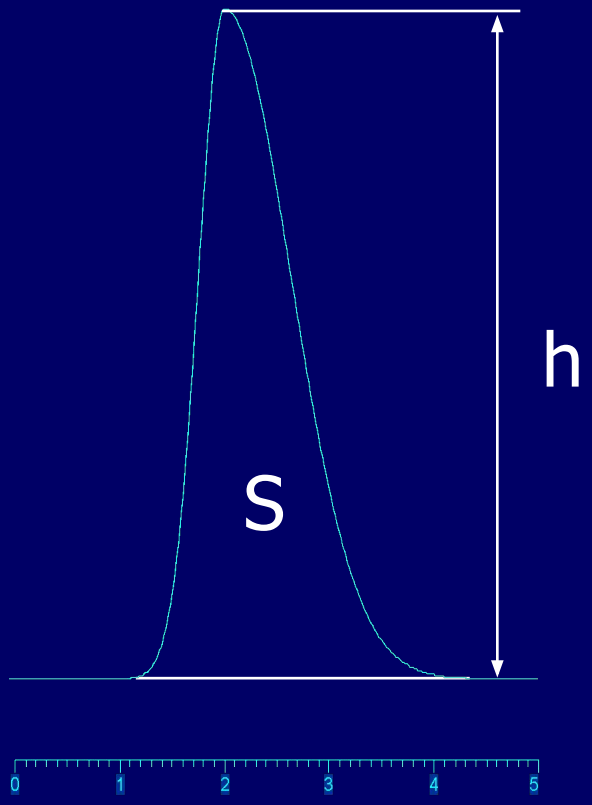
I – индекс Ковача для опознаваемого пика пробы,

$I_x$ - индекс Ковача для пика $X_i$ в БД,

d - критерий совпадения пиков, здесь - 0,5 единицы индекса

% - содержание компонента ( в % масс.).

# Количественный анализ в хроматографии



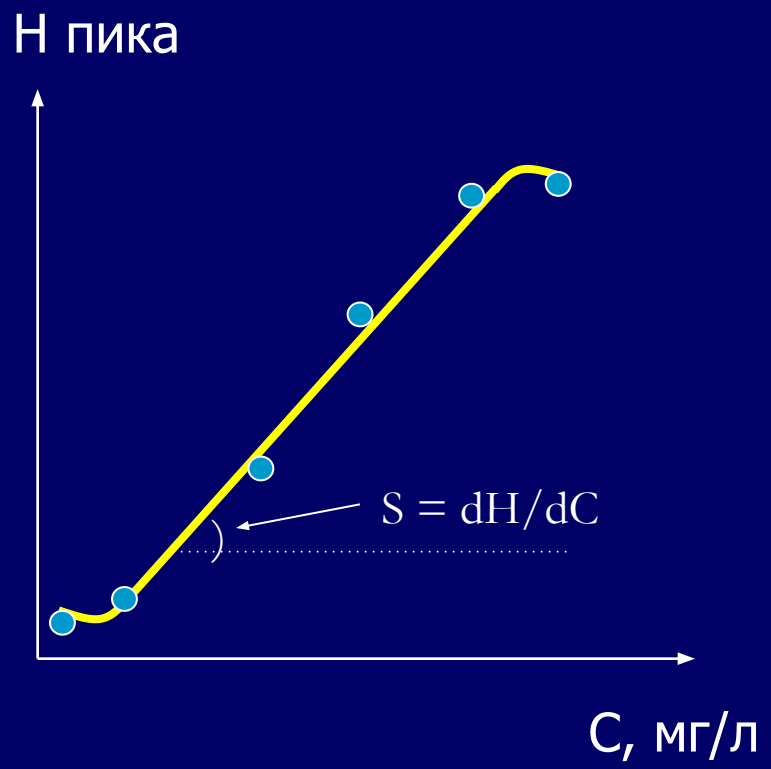

Аналитическим сигналом является не сигнал детектора, а высота или площадь пика.

**Высоту пика** можно использовать в качестве аналитического сигнала, если все пики узкие и симметричные.

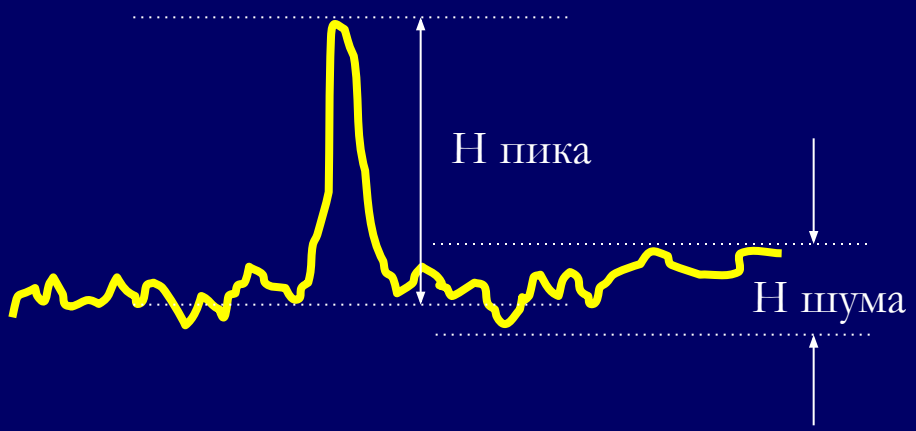
В любом случае содержание компонента можно рассчитывать **по площади** его пика. В случае широких или несимметричных пиков расчет возможен только по площади пика.

# Чувствительность и предел обнаружения

Чувствительность – определяется наклоном градуировочного графика




Предел обнаружения – наименьшее содержание, при котором компонент можно обнаружить с заданной вероятностью по данной методике



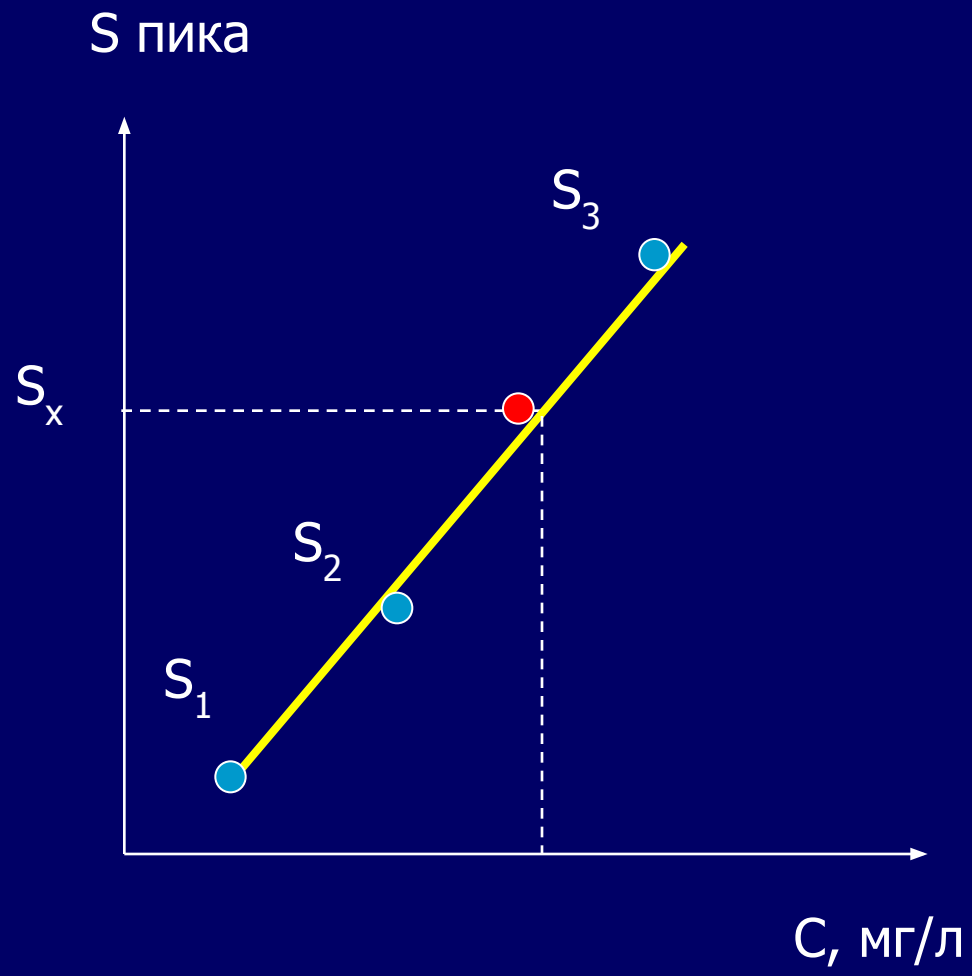

H пика = 3 * H шума

# Способы расчета результатов в хроматографии

| Способ | + | - |
|---|---|---|
| **Абсолютная калибровка** (внешний стандарт) | Простота, возможность автоматизации | При вводе пробы с помощью шприца - низкая точность |
| **Абсолютная калибровка** (метод добавок) | Не нужны стандартные образцы | Трудоемкость |
| **Внутренний стандарт** | Высокая точность | Трудоемкость |
| **Нормировка** | Экспрессность, отсутствие градуировки | Ограниченная применимость |

# Способ абсолютной калибровки

## (с применением внешнего стандарта)

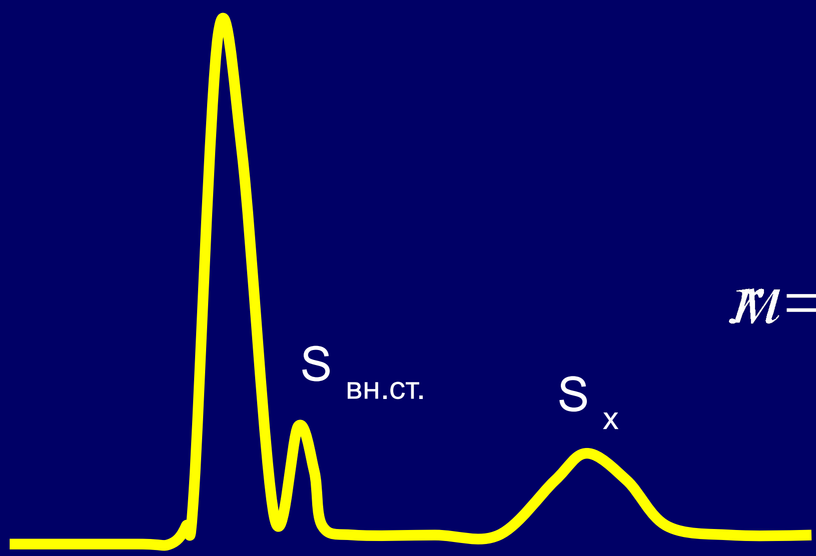



$$C_x = A \cdot S_x + B$$

# Способ внутреннего стандарта

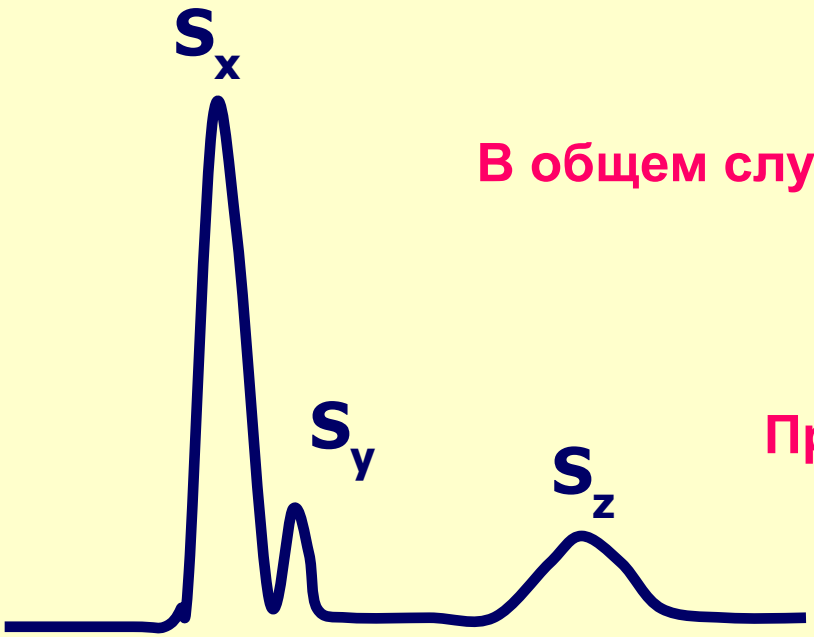
$$k = \frac{S_{вн.ст.}}{S_x}\frac{C_x}{C_{вн.ст.}}$$

$$r = \frac{m_{вн.ст.}}{m_{пробы}} \quad (m = масса,\ г)$$




$$x,\% = kr\frac{S_x}{S_{вн.ст.}}\cdot 100$$

# Способ нормировки



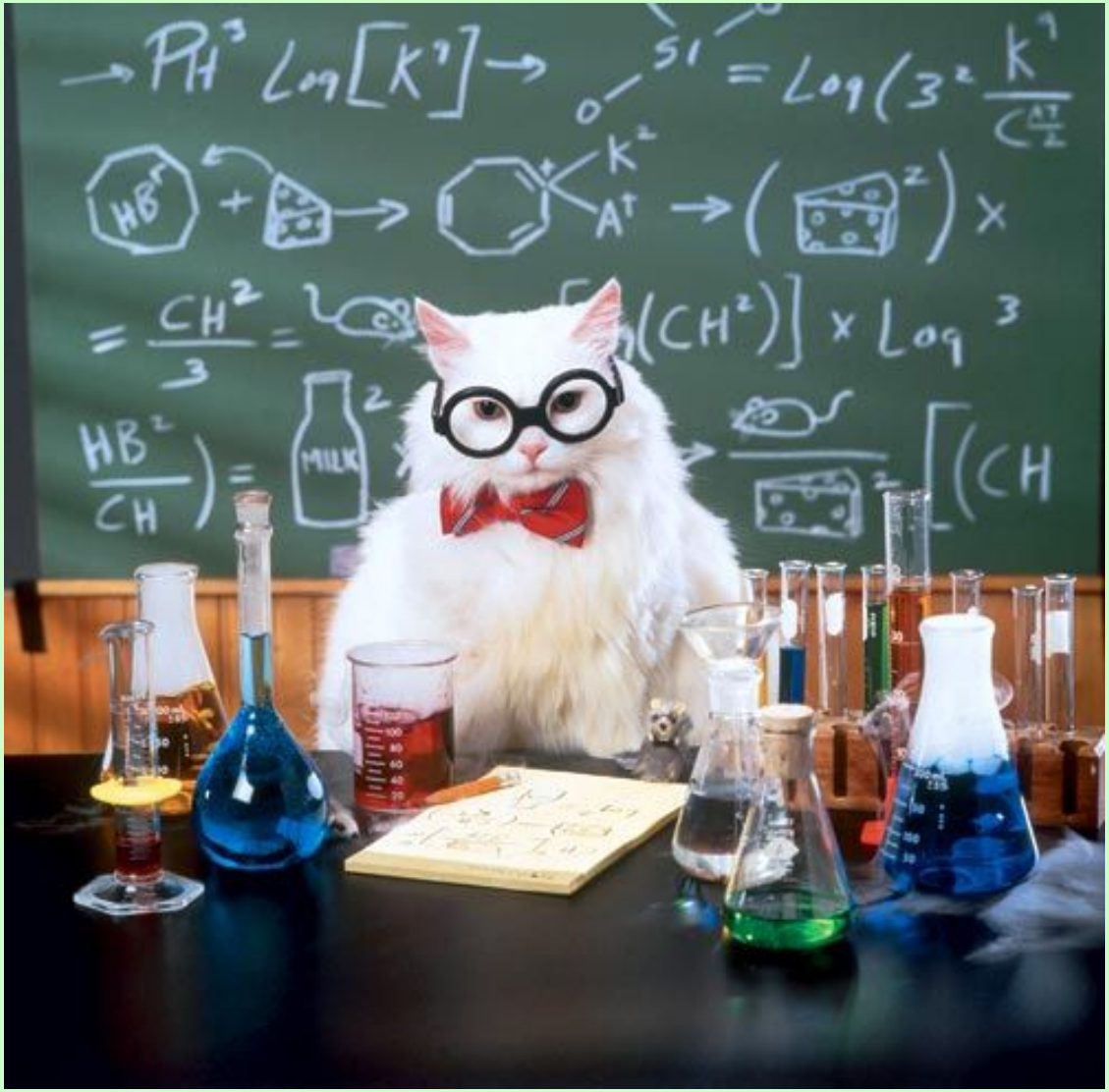

**В общем случае:** $$C_{i,\%} = \frac{k_i S_i \cdot 100\%}{\sum k_i S_i}$$

**При работе с ДИПом:**

$$C_{i,\%} = \frac{S_i \cdot 100\%}{\sum S_i}$$

Способ нельзя применять, если:

- проба не полностью испаряется;
- в испарителе или в колонке идут какие-либо химические реакции;
- некоторые компоненты остаются в колонке или их пики не регистрируются;
- нет полного разделения пиков на хроматограмме;
- детектор дает нелинейный отклик.
- неизвестны значения $k_i$ (требуется предварительное отнесение всех пиков на хроматограмме и градуировка детектора по эталону).




**Спасибо за внимание!**