**1 занятие**

**«ХРОМАТОГРАФИЯ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ПРИБОРЫ»**

 Использование различных физических и физико-химических свойств вещества в аналитических целях лежит в основе физико-химических методов анализа. Физико-химическими называют методы анализа, основанные на измерении физико-химических и физических свойств данного вещества. Их вместе с физическими методами анализа называют инструментальными, т.к. они требуют применения приборов и измерительных устройств.

 В основе физико-химических методов анализа лежит химическая реакция или физико-химический процесс.

 Характерная особенность физических методов заключается в том, что в них измеряют физические параметры без предварительного проведения химической реакции.

 Все аналитические методы имеют много общего: состав вещества, его строение и количество определяется по его свойствам. Свойства вещества фиксируются при помощи приборов.

Основной задачей прибора является перевод химической информации в форму, удобную для наблюдения оператором, что осуществляется при помощи преобразователя. Здесь электрический сигнал усиливается и передаётся на считывающее устройство.

 Выбор наилучшего метода анализа диктуется многими соображениями и представляет трудную задачу. Критериями для оценки и выбора методов анализа служат их метрологические характеристики:

- воспроизводимость

- предел обнаружения (чувствительность)

- верхняя и нижняя границы определяемых содержаний

Революция в инструментальных методах произошла в 30-е годы ХХ века. Это связано с бурным развитием электроники в то время.

**Классификация физико-химических методов**

 В зависимости от измеряемых характеристик различают следующие группы физико-химических методов:

1. **Оптические (спектральные)**, основанные на измерении оптических свойств анализируемых систем ( на взаимодействии веществ с электромагнитным полем). Они позволяют определять структуру, геометрию и полярность молекул, длины связей, а также количество вещества по интенсивности полос в спектре.

2. **Электрохимические,** основанные на измерении электрохимических свойств. Позволяют проводить анализ растворов электролитов.

3. **Физико-химические методы разделения и концентрирования** (хроматография, ионный обмен, диализ, электрофорез).

4. **Радиометрические**, основанные на измерении радиоактивности исследуемых объектов.

5. **Масс-спектрометрические**, основанные на ионизации атомов и молекул изучаемого вещества с последующим разделением образующихся ионов в пространстве и определения их масс. Позволяют определять состав и строение молекул, энергию тонизации, а также характеристики обратимых процессов.

Физико-химические методы анализа имеют следующие достоинства:

1. селективность: некоторые методы позволяют одновременно определять десятки компонентов, входящих в состав исследуемой системы;
2. экспрессность - высокая скорость выполнения анализа;
3. предел обнаружения ниже, чем у химических методов. Физико-химическими методами можно проводить анализ при содержании компонента 10-4 – 10-5 % масс, химическими методами – 10-1 – 10-2 % масс;
4. физико-химические методы дают возможность работать с ненарушенными образцами, поэтому они нашли широкое применение в биологии и медицине.

В 1903 г М.С. Цвет впервые изложил принципы хроматографии ( греч. « хромо» - цвет, «графо» - пишу) и создал метод разделения пигментов зелёных растений.

Хроматографический метод позволяет разделять и анализировать сложные смеси. Разделение веществ происходит за счёт различной адсорбируемости компонентов смеси.

Хроматография – это динамический процесс, происходящий в системе из двух несмешивающихся фаз, одна из которых подвижная, другая неподвижная. Подвижной фазой может быть либо газ, либо жидкость, а неподвижной – твёрдое вещество или тонкая плёнка жидкости, адсорбированной на твёрдом теле.

Хроматография – это метод разделения сложных смесей, основанный на распределении веществ между двумя фазами, одна из которых неподвижна, а другая – поток, движущийся через неподвижную фазу (подвижная).

Хроматография основана на многократном повторении актов сорбции и десорбции веществ при их перемещении в потоке подвижной фазы вдоль неподвижного сорбента.

Для хроматографического разделения смесей веществ может быть использован любой механизм сорбции.

Подвижная фаза - жидкость или газ;

Неподвижная фаза - твердый носитель, адсорбированное твердое вещество или раствор.

Этапы развития хроматографии:

1903 г. Открытие хроматографии (Цвет М.С.)

1938 г. Тонкослойная или планарная хроматография (Измайлов Н.А., Шрайберг М.С.)

1941 г. Жидкостная распределительная хроматография (Martin A.D.P., Synge R.L.M.)

1952 г. Газовая распределительная хроматография (Martin A.D.P., James A.)

1956 г. Капиллярная газовая хроматография (Golay M.)

1975 г. Ионная хроматография (Small H., Stevens T.S., Bauman W.W.)

1990+ Хроматомасс-спектрометрия

Основные хроматографические понятия:

* **Неподвижная (стационарная) фаза** - элюент, твердый носитель (с покрытием);
* **Подвижная фаза** представляет собой жидкость или газ, протекающий через неподвижную фазу, иногда под давлением.
* **Сорбция** – концентрация одного из веществ в одно из фаз.
* **Адсорбция** – поглощение вещества на поверхности твердого или жидкого тела.
* **Абсорбция** – поглощение газов, паров или растворенных веществ во всем объеме твердой или жидкой фазы. **Сорбенты**  — твёрдые вещества или жидкости, избирательно поглощающие (*сорбирующие*) из окружающей среды газы, пары или растворённые вещества.
* **Элюация**- вытеснение вещества мутём промывания соответственный растворителем (элюент).

**Классификация хроматографических методов**

**Классификация хроматографических методов по агрегатному состоянию фаз**

**Газовая хроматография**

* Подвижная фаза – инертный газ (газ-носитель)
* Большое влияние оказывает температура
* Для хроматографирования летучих веществ и газов
1. газо-твердофазная (газо-адсорбционная)
2. газо-жидкостная

**Жидкостная хроматография**

* ПФ – жидкость
* Подходит для хроматографирования полярных веществ и макромолекул
1. жидкостно-жидкостная
2. жидкостно-твердофазная
3. жидкостно-гелевая

**Классификация хроматографических методов по механизму разделения (по характеру элементарного акта)**

1. **Адсорбционная** – основана на различной адсорбции веществ на поверхности сорбента
2. **Распределительная** – основана на различной растворимости (абсорбции) веществ в ПФ и НФ
3. **Ионообменная** – основана на различной способности к ионному обмену
4. **Хелатная** – основана на различной способности к образованию хелатных комплексов
5. **Гель-фильтрационная** (эксклюзионная, гель-проникающая) – основана на различной способности к проникновению в поры носителя. Вещества разделяются по размеру, первыми из колонки выходят вещества с большей молекулярной массой, так как они имеют больший размер и не задерживаются в порах.
6. **Хемихроматография** – основана на различной реакционной способности. Скорость продвижения продукта реакции по НФ пропорциональна константе равновесия реакции.
7. **Аффинная** – основана на различной биоспецифичности аналита и лиганда. Вещества, обладающие большим сродством к лигандам (молекулам, ковалентно связанными с НФ), задерживаются, в то время как остальные "смываются" подвижной фазой.

### Классификация хроматографических методов по способу перемещения сорбатов вдоль слоя сорбента

#### Проявительная (элюентная) хроматография

Хроматографируемая смесь делится в колонке на отдельные зоны, разделенные участками ПФ. Подходит для разделения многокомпонентной смеси.

Недостатки: требуется много растворителя

#### Фронтальная хроматография

Достоинства:

* эффективный метод
* требуется малое количество растворителя

Недостатки: только один компонент чистый

Применятся в установках по уменьшению жесткости воды, в респираторах, в промышленных фильтрах.

#### Вытеснительная хроматография

Используется не чистый растворитель, а вещество (вытеснитель) с высокой сорбционной способностью.

Достоинства:

* высокая производительность
* требуется малое количество растворителя
* нет размывания зон
* скорость постоянна и равна скорости движения вытеснителя

Недостатки: большая продолжительность хроматографического процесса

### Классификация хроматографических методов по способу проведения

1. Колоночная
2. Планарная

2.1 бумажная
2.2 тонкослойная

### Классификация хроматографических методов по целям и задачам

1. Аналитическая хроматография – получение информации (качественный и количественный анализ)
2. Препаративная хроматография – разделение и очистка веществ
3. Промышленная хроматография – автоматизированный контроль выбросов

## Хроматографическая картина разделения

1. Интегральная (практически не применяется)
2. Дифференциальная

**Основные принципы хроматографического разделения. Колоночная хроматография**

Рассмотрим внешнюю хроматограмму двух веществ. По оси Х откладывается время хроматографирования или объем эффлюента, по оси У – аналитический сигнал.



Рис. Дифференциальная хроматограмма: 1 – нулевая линия; 2 – пик несорбирующегося компонента; 3, 4 – пики определяемых компонентов; tR –время удерживания; h – высота пика; μ – ширина пика

1. Высота выходной кривой (пика) h – это перпендикуляр, опущенный из максимума пика на нулевую линию. Нулевая линия – часть хроматограммы, полученная при регистрации сигнала детектора во время выхода из колонки чистой подвижной фазы.

2. Ширина пика μ – отрезок, отсекаемый на нулевой линии касательными к кривой в точках перегиба, или расстояние между точками контура пика на середине высоты μ0,5.

3. Сорбционная способность неподвижной фазы по отношению к разделяемым веществам характеризуется временем удерживания tR. Время удерживания tR – это время, прошедшее от момента ввода пробы в колонку до момента выхода максимума пика вещества, т.е. это время пребывания вещества в подвижной и неподвижной фазе. Это очень важная величина, так как если условия разделения (скорость потока подвижной фазы, давление, температура, состав подвижной и неподвижной фаз) постоянны, то время удерживания строго воспроизводимо и является характеристикой вещества, поэтому может быть использовано для идентификации веществ.

4. Удерживающий объем VR является такой же важной характеристикой: VR = F ∙ tR, где F – объемная скорость потока. Символами tR0 и VR0 обозначают время и объем удерживания несорбирующегося компонента.

5. Разделение двух соседних пиков характеризуется разрешением. Разрешение пиков зависит от их остроты (ширина полос) и от расстояния между максимумами (разделение полос). Острота пиков зависит от эффективности колонки, а расстояние между максимумами определяется ее селективностью.

Под эффективностью колонки понимают получение узких пиков, т.е. ограничение размывания (расширения) полос. В эффективной колонке размывание полос небольшое и пики получаются узкими. Расстояние между максимумами пиков определяется селективностью колонки, т. е. селективностью сорбента и различиями в термодинамических свойствах хроматографируемых веществ по отношению к хроматографической системе.

Селективность колонки зависит от констант и коэффициентов распределения компонентов смеси и коэффициентов емкости колонки. При малых значениях коэффициентов компоненты слабо удерживаются колонкой, и наблюдается плохое разделение. При больших значениях коэффициентов – разделение увеличивается, но растет и время разделения.

Количественный анализ проводят, измеряя высоту или площадь пика, так как эти параметры пропорциональны концентрации вещества или его количеству в хроматографической зоне.

Высота пика используется только тогда, когда время удерживания малое (пик острый) и форма пика не искажена (высота пика изменяется линейно). Поэтому площадь пика используется чаще.

Для расчета хроматограмм используют несколько методов:

1) нормировки (метод внутренней нормализации);

2) внешнего стандарта (градуировочного графика);

3) внутреннего стандарта.

Осадочная хроматография

Качественный анализ

Если зоны хроматограммы окрашены, то по их числу, окраске и расположению судят о качественном составе анализируемой смеси. Если хроматограмма бесцветна, то используют раствор проявителя, образующего окрашенные соединения с разделяемыми ионами.

Количественный анализ

Используют зависимость высоты зоны хроматограммы от концентрации вещества.