**Учреждение образования «БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ   
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**Факультет** технологии органических веществ

**Кафедра** физико-химических методов сертификации продукции

**Специальность** 1-54 01 03 «Физико-химические методы и приборы контроля   
качества продукции»

**Специализация** 1-54 01 03 02 «Сертификация продовольственных товаров»

**КУРСОВАЯ РАБОТА**

по дисциплине **«Физико-химические методы и приборы контроля»**

**Тема**: «Исследование биологических объектов с применением современных   
методов хроматографического анализа»

**Выполнила:**

студентка 4 курса

группы 13 М. Н. Бартош

**Руководитель:**

О.В. Стасевич

**Минск 2010**

Задание

**РЕФЕРАТ**

Работа содержит с., рис., табл., источников, прил.

МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ, БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОБЪЕКТЫ, ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ, СТАНДАРТИЗОВАННАЯ МЕТОДИКА

Целью курсовой работы являлось изучение исследования биологических объектов с применением современных методов хроматографического анализа, ознакомление с нормативными документами по применению данных методов для контроля качества продукции.

**СОДЕРЖАНИЕ**

# ВВЕДЕНИЕ

Несколько последних десятилетий можно охарактеризовать как период интенсивного развития и распространения инструментальных методов анализа, в том числе и при осуществлении контроля качества продукции. В первую очередь это относится к хроматографическим методам анализа. В настоящее время невозможно представить не использующие эти аналитические методы даже производственные лаборатории, не говоря уже об испытательных.

Это связано, в первую очередь, с усложнением задач, которые стоят перед аналитиками и обусловлены необходимостью обнаруживать и определять все меньшие количества различных веществ, находящихся в анализируемых объектах в большинстве случаев в виде многокомпонентных смесей. Практически только благодаря тому, что аналитические характеристики методик анализа, основанные на использовании различных вариантов хроматографии, существенно выше аналогичных показателей методик, которые базируются на классических химических методах, решение этих задач является возможным.

Широкое распространение инструментальных методов обусловлено и тем, что развитие приборостроения привело к тому, что очень многие приборы стали достаточно доступными не только для проведения научных исследований, но и для рутинного анализа при контроле качества продукции, а их широкая компьютеризация и разработка эффективного программного обеспечения облегчила и ускорила обработку получаемой информации.

Абсолютное большинство веществ живой и неживой природы и синтетических веществ, используемых в производстве самых разнообразных продуктов питания, представляют собой не индивидуальные химические соединения, а сложные многокомпонентные смеси веществ. Большинство современных методов физических и физико-химических методов анализа, применяемых для контроля компонентного состава вещества, дают аддитивную величину измеряемого аналитического сигнала, которая слагается из его величин, образуемых отдельными компонентами смеси, зачастую имеющими различную химическую природу и различное влияние на качество продукции. Поэтому приходится применять те или иные методы разделения смесей веществ.

В последнее время широкое распространение получил хроматографический метод разделения смеси веществ, который также применяется для анализа многокомпонентных смесей.

В данной курсовой работе рассмотрены различные виды хроматографического метода, их применение для анализа биологических сред, в том числе для контроля качества продукции, а также рассмотрена нормативная база по применению метода, приведена стандартизованная методика контроля [1, c. 5-8].

# 1 ИСТОРИЯ МЕТОДА

Хроматографический метод анализа был впервые применён русским учёным-ботаником Михаилом Семеновичем Цветом в 1900 году. Он использовал колонку, заполненную карбонатом кальция для разделения пигментов растительного происхождения. При вымывании пигментов петролейным эфиром они перемещались вдоль колонки, разделяясь при этом на кольца разного цвета. Первое сообщение о разработке метода хроматографии было сделано Цветом 30 декабря 1901 года на XI Съезде естествоиспытателей и врачей в С.-Петербурге. Первая печатная работа по хроматографии была опубликована в 1903 году, в журнале Труды Варшавского общества естествоиспытателей. Впервые термин хроматография появился в двух печатных работах Цвета в 1906 году, опубликованных в немецком журнале Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft [2].

Характеризуя принципы предложенного им метода, М. Цвет пивал: «При фильтрации смешанного раствора через столб адсорбента пигменты расслаиваются в идее отдельных различно окрашенных зон. Подобно световым лучам в спектре, различные компоненты сложного пигмента закономерно распределяются друг за другом в столбе адсорбента и становятся доступными качественному определению. Такой расцвеченный препарат я назвал хроматограммой, а соответствующий метод – хроматографическим методом» [1, c. 9].

В 1907 году Цвет демонстрирует Немецкому Ботаническому обществу образец хроматографа — прибора для осуществления процесса хроматографии. В 1910-1930 годы метод был незаслуженно забыт и практически не развивался [2].

Расцвет и бурное развитие хроматографии начались с 1931 г., когда уже были разработаны основы теории адсорбции и ионного обмена и синтезированы новые органические и неорганические сорбенты. Развитие хроматографии связано с именами Р. Куна, Е. Ледерера, А. Винтерштейна, А. Измайлова. Усилиями этих и многих других ученых были разработаны разнообразные варианты хроматографического анализа: тонкослойная (1938 г. Н. Измайлов), бумажная (1941 г., А. Мартин, Р. Синдж), газоадсорбционная (1940 г.), газожидкостная (1952 г., А. Мартин), капиллярная (1957 г., М. Голей), высокоэффективная жидкостная (60-е гг. ХХ в.), ионная хроматография (1970 г., Х. Смолл, Т. Стивенс) [1, c. 9-10].

В 1952 году Дж. Мартину и Р. Синджу была присуждена Нобелевская премия по химии за создание метода распределительной хроматографии. С середины 20 века и до наших дней хроматография интенсивно развивалась и стала одним из наиболее широко применяемых методов анализа [2].

# 2 ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

## 2.1 Общая характеристика

Хроматография (от греч. *chroma, chromatos* - цвет, краска)*, ⎯* физико-химический метод разделения и анализа смесей, основанный на распределении их компонентов между двумя фазами - неподвижной и подвижной (элюент), протекающей через неподвижную [2]. Неподвижной (стационарной) фазой служит твердое вещество (сорбент), пленка жидкости, нанесенная на твердое вещество (носитель), гелеобразное вещество, вещество способное к реакциям ионного обмена или обмена другого типа. Подвижная фаза представляет собой жидкость или газ, протекающий через неподвижную фазу.

В процессе хроматографирования вещества, которые входят в анализируемую смесь и помещаются в большинстве случаев в заполненную неподвижной (стационарной) фазой стеклянную, металлическую или пластиковую трубку, называемую хроматографической колонкой, подвергаются одновременному воздействию двух факторов: поток подвижной фазы перемещает их по колонке, а неподвижная фаза тормозит это движение. Торможение (удерживание) каждого компонента различное и пропорционально силе его взаимодействия с неподвижной фазой. В результате этого входящие в анализируемую пробу индивидуальные вещества, слабее взаимодействующие с неподвижной фазой перемещаются по колонке быстрее, чем более сильно взаимодействующие вещества, и в конечном итоге при подборе оптимальных условий разделения каждый компонент анализируемой смеси концентрируется в колонке в чистом виде, отдельно от других компонентов, перемещается и выходит из колонки отдельно [1, c. 10].

Хроматографический анализ является критерием однородности вещества: если каким-либо хроматографическим способом анализируемое вещество не разделилось, то его считают однородным (без примесей).

Принципиальным отличием хроматографических методов от других физико-химических методов анализа является возможность разделения близких по свойствам веществ. После разделения компоненты анализируемой смеси можно идентифицировать (установить природу) и количественно определять (массу, концентрацию) любыми химическими, физическими и физико-химическими методами.

Хроматография широко применяется в лабораториях и в промышленности для качественного и количественного анализа многокомпонентных систем, контроля производства, особенно в связи с автоматизацией многих процессов, а также для препаративного (в т. ч. промышленного) выделения индивидуальных веществ (например, благородных металлов), разделения редких и рассеянных элементов.

В некоторых случаях для идентификации веществ используется хроматография в сочетании с другими физико-химическими и физическими методами, например с масс-спектрометрией, ИК-, УФ-спектроскопией и др. Для расшифровки хроматограмм и выбора условий опыта применяют ЭВМ [2].

В отличие от других методов, основанных на распределении компонентов между фазам, таких как экстракция или сорбция, хроматография ­ это динамический процесс, состоящий из многократных актов сорбции­десорбции компонентов, так как они происходят в потоке подвижной фазы. Такой динамический характер обеспечивает достижение значительно более высокой эффективности хроматографии по сравнению с сорбцией и экстракцией в статических условиях [1, c. 11].

Основные достоинства хроматографического анализа:

* экспрессность; высокая эффективность; возможность автоматизации и получение объективной информации;
* сочетание с другими физико-химическими методами;
* широкий интервал концентраций соединений;
* возможность изучения физико-химических свойств соединений;
* осуществление проведения качественного и количественного анализа;
* применение для контроля и автоматического регулирования технологических процессов [2].

## 2.2 Классификация хроматографических методов

В основу классификации многочисленных хроматографических методов положены следующие признаки: механизм взаимодействия сорбент – сорбат, агрегатное состояние подвижной и неподвижной фаз, форма слоя сорбента (техника выполнения), цель хроматографирования.

В зависимости от механизма взаимодействия, обусловливающего распределение компонентов между элюентом и неподвижной фазой, различают следующие основные виды хроматографии:

**-** *адсорбционная хроматография* основана на различии сорбируемости разделяемых веществ адсорбентом (твёрдое тело с развитой поверхностью);

**-** *распределительная хроматография* - на разной растворимости компонентов смеси в неподвижной фазе (высококипящая жидкость, нанесённая на твёрдый макропористый носитель) или на различии в растворимости веществ в подвижной и неподвижной жидких фазах;

**-** *ионообменная хроматография* - на различии констант ионообменного равновесия между неподвижной фазой (ионитом) и компонентами разделяемой смеси; **-** *эксклюзионная* (молекулярно-ситовая) хроматография **-** на разной проницаемости молекул компонентов в неподвижную фазу (высокопористый неионогенный гель);

**-** *осадочная хроматография* - на различной способности разделяемых компонентов выпадать в осадок на твёрдой неподвижной фазе;

**-** *аффинная хроматография*– на специфических взаимодействиях, характерных для некоторых биологических и биохимических объектов (антитело и антиген, фермент и его субстрат);

- *адсорбционно-комплексообразовательная хроматография* – на возникновении координационных соединений разной устойчивости в фазе или на поверхности сорбента.

Классификация хроматографических методов по механизму разделения весьма условна: часто процесс разделения протекает сразу по нескольким механизмам   
[1, c.11-12].

В соответствии с агрегатным состоянием элюента различают:

* газовую хроматографию (подвижная фаза – газ);
* жидкостную хроматографию (подвижная фаза – жидкость);
* сверхкритическую флюидную, где подвижной фазой является вещество, находящееся в сверхкритическом состоянии (флюид).

Газовая хроматография подразделяется на газотвердофазную и газожидкостную, жидкостная – на жидкостно-жидкостную и жидкостно-гелевую. Первое слово в названии метода характеризует агрегатное состояние подвижной фазы, второе – неподвижной.

Газовая хроматографияприменяется для разделения газов, определения примесей вредных веществ в воздухе, воде, почве, промышленных продуктах; определения состава продуктов основного органического и нефтехимического синтеза, выхлопных газов, лекарственных препаратов, а также в криминалистике и т.д.

Жидкостная хроматографияиспользуется для анализа, разделения и очистки синтетических полимеров, лекарственных препаратов, детергентов, белков, гормонов и др. биологически важных соединений. Использование высокочувствительных детекторов позволяет работать с очень малыми количествами веществ (10-11-10-9 *г*)*,* что исключительно важно в биологических исследованиях.

По технике выполнения различают колоночную и плоскостную хроматографию. В колоночной хроматографии сорбентом заполняют специальные трубки - колонки, а подвижная фаза движется внутри колонки благодаря перепаду давления. Разновидность колоночной хроматографии - капиллярная, когда тонкий слой сорбента наносится на внутренние стенки капиллярной трубки. Плоскостная хроматография подразделяется на тонкослойную и бумажную. В тонкослойной хроматографии тонкий слой гранулированного сорбента или пористая плёнка наносится на стеклянную или металлическую пластинки; в случае бумажной хроматографии используют специальную хроматографическую бумагу. Тонкослойная (ТСХ) и бумажная хроматография используются для анализа жиров, углеводов, белков и др. природных веществ и неорганических соединений [2].

## 2.3 Хроматографические параметры

Результатом хроматографического разделения исследуемой пробы является хроматограмма. Различают внутреннюю и внешнюю хроматограммы. Внутренняя хроматограмма – это распределение разделенных веществ вдоль колонки в виде отдельных полос (зон). Внешняя хроматограмма – это графическое изображение распределения веществ в элюате, кривая зависимости сигнала детектора хроматографа от времени или объема элюата , прошедшего через колонку. (Элюат - подвижная фаза, выходящая из колонки и содержащая разделенные компоненты.)

Идеализированная внешняя хроматограмма смеси двух веществ представлена на рисунке 2.1.

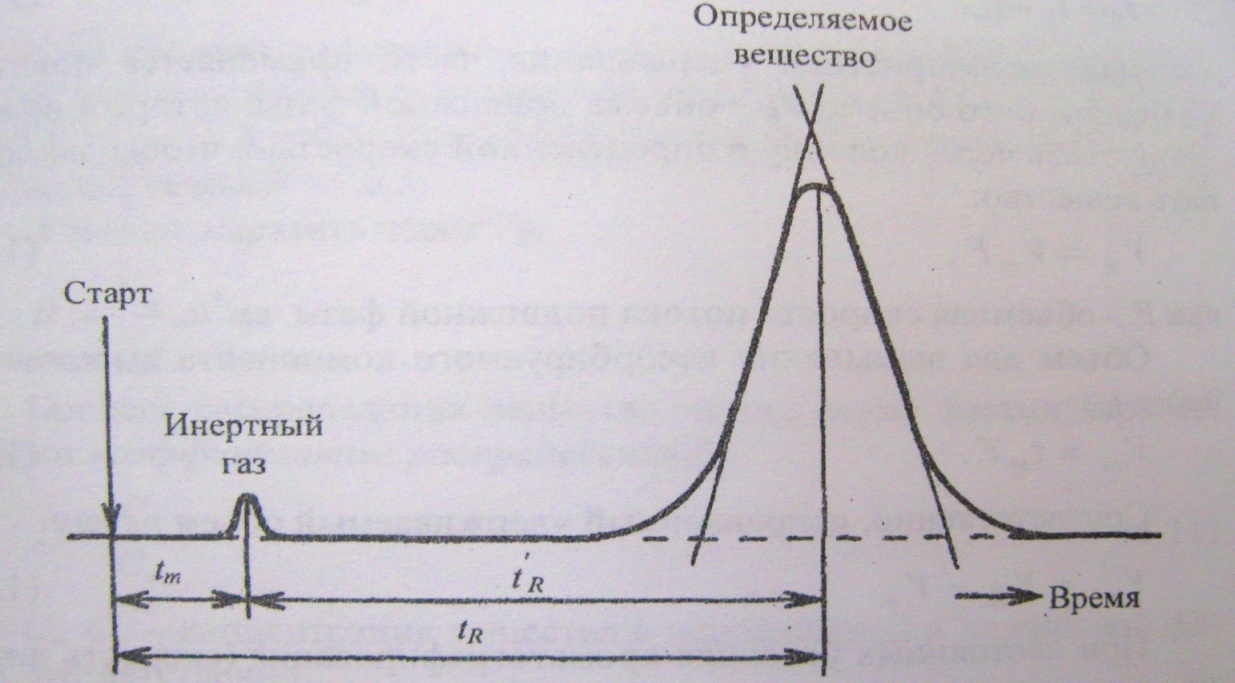


Рисунок 2.1 – Вид внешней хроматограммы двухкомпонентного вещества,   
полученной при элюентном разделении

На внешней хроматограмме по оси абсцисс отложено время хроматографирования (можно отложить объем элюата), по оси ординат – аналитический сигнал детектора хроматографа, зависящий от содержания вещества в элюате и чувствительность детектора к компонентам анализируемого вещества.

Время oт момента ввода анализируемой пробы до регистрации максимума пика называют временем удерживания (элюирования) данного компонента. Время удерживания каждого компонента складывается из двух составляющих - времени пребывания в подвижной фазе и неподвижной

=+. (2.1)

Значение фактически равно времени прохождения через колонку несорбируемого компонента (газа-носителя в газовой хроматографии элюата - в жидкостной). I

Время удерживания не зависит от количества пробы, но зависит от природы вещества и сорбента, упаковки сорбента, скорости подачи подвижной фазы и может меняться от колонки к колонке. Поэтому истинную способность данного вещества удерживаться в хроматографической колонке характеризуют исправленным временем удерживания:

(2.2)

Для характеристики удерживания часто применяется понятие удерживаемого объема - объема подвижной фазы, который нужно пропустить через колонку с определенной скоростью, чтобы элюировать вещество:

(2.3)

где - объемная скорость потока подвижной фазы, см3/с.

Объем для вымывания несорбируемого компонента выражается через :

(2.4)

Соответственно, исправленный удерживаемый объем равен:

= (2.5)

При постоянных условиях хроматографирования скорость потока элюента, давление газа-носителя, температура, состав фаз) значение и строго воспроизводимы и используются для идентификации веществ. Массу вещества, вымываемого из колонки, можно найти по площади под кривой элюирования:

(2.6)

где С - концентрация, ммоль/мл; V- объем, мл.

В хроматографии часто используется такой параметр, как коэффициент удерживания (замедления) R, равный отношению скорости движения анализируемого вещества к скорости движения подвижной фазы:

R = (2.7)

Для эффективного хроматографирования необходимо, чтобы *R*<<0,5.

Процесс распределения вещества между двумя фазами характеризуют коэффициентом распределения D:

(2.8)

где **,**  - концентрация вещества в неподвижной и подвижной фазах соответственно.

Коэффициент распределения связан с хроматографическими параметрами, так как отношение времени пребывания вещества в неподвижной и подвижной фазах фазах равно отношению количества вещества в этих фазах:

(2.9)

Произведение называют коэффициентом емкости . Эта величина показывает, во сколько раз вещество дольше находится в неподвижной фазе, чем в подвижной. Оптимальные значения лежат в пределах 1,5 - 4,0.

Если коэффициент распределения мал, то мало значение , т. е. вещество плохо удерживается и продвигается по колонке с той же скоростью, что и подвижная фаза. Если же коэффициент емкости слишком велик, то время пребывания вещества в колонке будет большим и на анализ потребуется много времени.

Исправленный удерживаемый объем связан с *D* отношением

. (2.10)

Выражение (2.10) - основное уравнения хроматографии - показывает, что пропорционален величине D и объему неподвижной фазы колонки Vs. Величина Vs зависит от количества неподвижной фазы, содержащейся в единице объема колонки. Если значения и для двух веществ А и В различаются сильно, это свидетельствует о том, что их разделение на хроматографической колонке будет полным.

При хроматографировании происходит разделение компонентов смеси веществ и размывание хроматографических пиков разделяемых веществ, приводящее к ухудшению разделения. Выявить причины размывания пиков и прогнозировать эффективность разделения смеси веществ позволяет теория хроматографии.

## 2.4 **Межмолекулярные взаимодействия, лежащие в основе хроматографических процессов**

Хроматографическое разделение определяется различной сорбцией компонентов смеси, что связано с природой сорбента и разделяемых веществ и, соответственно, с тем, что в каждой конкретной системе «сорбент - разделяемые вещества» в различной степени проявляются силы межмолекулярного взаимодействия.

Межмолекулярные взаимодействия, лежащие в основе хроматографических процессов, представляют собой кулоновские силы взаимодействия между электронами и ядрами одной молекулы с ядрами и электронами другой. Величина этих сил зависит от расстояния между молекулами, их взаимной ориентации, а также строения и физических характеристик взаимодействующих молекул (дипольного мо­мента, поляризуемости и др.). Межмолекулярные взаимодействия подразделяют на три вида: электростатические (ориентационные, силы Кеезома), поляризационные (индукционные, силы Дебая) и дисперсионные (силы Лондона).

Электростатическое (ориентационное) межмолекулярное взаимодействие обусловлено тем, что электрический потенциал вокруг молекулы может изменяться не только по абсолютной величине, но и по знаку. Если взаимная ориентация двух молекул оказывается такой, что область положительного потенциала одной из них (например, молекулы адсорбента) приблизительно совпадает с областью, в которой локализован отрицательный заряд другой (компонента анализируемой смеси), происходит электростатическое взаимное притяжение молекул. Такой вид взаимодействий реализуется, если взаимодействующие молекулы являются полярными.

Поляризационное (индукционное) межмолекулярное взаимодействие обусловлено деформацией электронной оболочки нейтральной молекулы под влиянием электростатического поля другой, в результате которой в первой молекуле возникает так называемый индуцированный диполь.

При соответствующих условиях происходит электростатическое взаимодействие электрического поля второй молекулы с индуцированным диполем первой. Такой тип взаимодействий реализуется, если, например, в зоне полярного адсорбента - кремнезема окажется неполярное вещество. В этом случае электро­статический заряд кремнезема может индуцировать появление некоторого дипольного момента в сорбируемой молекуле (деформацию ее электронного облака, поляризацию молекулы) и электростатическое взаимодействие возникнет между адсорбентом и индуцированным диполем этой молекулы. Поляризация молекул и индуцирование диполей может произойти и в неполярном адсорбенте (например, угле) при условии, что на соответствующем расстоянии от его поверхности окажется полярная молекула сорбируемого вещества.

Дисперсионное межмолекулярное взаимодействие обусловлено согласованным движением электронов в сближающихся молекулах. Вследствие движения электронов даже молекулы с симметричным средним распределением электронной плотности имеют флуктуирующие (колеблющиеся по направлению) отклонения этой плотности от средней, т. е. флуктуирующие диполи, квадруполи и т. п. При сближении молекул движения этих флуктуирующих мультиполей разных молекул перестают быть независимыми, что и вызывает их взаимное притяжение. Межмолекулярные взаимодействия дисперсионного типа характерны, например, для молекул, имеющих π-связи (например, непредельных и ароматических углеводородов).

Кроме указанных видов межмолекулярных взаимодействий, на распределение компонентов между подвижной и неподвижной фазами могут оказывать влияние специфические силы взаимодействия между адсорбентом и разделяемым веществом. К ним отно­сится водородная связь, возникающая между атомом водорода и такими атомами, как О, CI, F, N. Возможно также комплексообразование между компонентами разделяемых смесей и адсорбентом, но для селективного разделения вещества газовой хроматографией это явление используется редко.

Об осуществимости разделения смеси веществ на данном сорбенте можно судить на основании сведений по термодинамике сорбции (адсорбции или ионного обмена). Теоретический подход, объясняющий разделение, основан на изучении форм изотерм сорбции - графической зависимости концентрации вещества в неподвижной фазе от его концентрации в подвижной фазе при постоянной температуре. Изотерма сорбции может иметь различные формы (рис. 2.2).

2 1 3

ν

Рисунок 2.2 – Формы изотермы сорбции на сорбенте:

1 – линейная; 2 – выпуклая; 3 – вогнутая

Если изотерма линейна, *D=const,* то зона сорбции симметрична, концентрация вещества максимальна в центре зоны и симметрично убывает к её краям. При вогнутой и выпуклой изотермах сорбции пики несимметричны вследствие размывания передней и задней части зоны соответственно. В процессе хроматографического разделения часто происходит размывание пиков. Причины этого специфического процесса рассматриваются теорией теоретических тарелок и кинетической теорией хроматографии[1, c. 15-23].

## 2.5 Теория теоретических тарелок

Теория теоретических тарелок разработана для описания процесса дистилляции, однако она является общей для всех многостадийных процессов. На хроматографический процесс эта теория была распространена Мартином и Синджем.

Теория теоретических тарелок является формальной и основана на представлении, что хроматографируемое вещество проходит через слой сорбента не непрерывным потоком, а порциями, распределяясь между подвижной и неподвижной фазами на отдельных элементарных участках слоя - так называемых «тарелках». Через каждую такую тарелку вещество проходит периодическими толчками. При этом предполагается, что за время каждого толчка, т. е. практически мгновенно, на тарелках успевает установиться равновесие распределения всех компонентов между подвижной и неподвижной фазами.

Таким образом, согласно этой теории, хроматографический процесс является многоступенчатым и состоит из большого числа актов сорбции-десорбции или растворения-испарения компонентов анализируемого вещества в хроматографической колонке, а сама колонка рассматривается как совокупность многих дискретных ступеней - тарелок, хотя в действительности слой адсорбента или пленка непод­вижной жидкой фазы в колонке является непрерывным. Анализируемое вещество вместе с элюентом попадает на первую тарелку. Новая порция элюента, подаваемая на первую тарелку, приводит к новому распределению вещества между подвижной и неподвижной фазами, причем часть вещества с данной тарелки переносится на следующую. На этой тарелке также мгновенно устанавливается равновесие, а часть вещества уносится на следующие тарелки. Вследствие этого с каждой новой порцией элюента концентрация вещества на первой тарелке падает, а на последующих - возрастает.

В результате такого перемещения и перераспределения хроматографируемое вещество оказывается не на одной, а на нескольких тарелках, причем на средних его концентрация достигает максимального значения по сравнению с соседними, так как свежие порции элюента, поступающие в колонку, встречают на первых тарелках все меньшие количества данного компонента в неподвижной фазе. Таким образом, вещество размывается по некоторой толщине слоя неподвижной фазы в колонке, по нескольким тарелкам, причем чем сильнее размывание, тем большее число тарелок занимает вещество. Следовательно, число тарелок, занимаемых данным компонентом анализируемого вещества, может служить мерой степени размывания вещества по слою адсорбента, мерой эффективности колонки.

Такой прием замены реального процесса эквивалентным по результатам многоступенчатым дискретным процессом позволил на основании теории скоростей вывести уравнение хроматографической кривой, т. е. дал математическую модель продвижения полосы компонента через колонку.

При условии линейной изотермы сорбции и с учетом факторов размывания уравнение распределения концентрации вещества в зоне имеет следующий вид:

(2.11)

где - число теоретических тарелок, занятых компонентом смеси; - относительный объем подвижной фазы, прошедшей через колонку; – весь объем элюента, прошедшего через колонку; объем газа на одной тарелке.

Это уравнение представляет собой уравнение Гаусса, характеризующее распределение вещества в зоне. Фактически величина С/Сmax пропорциональна сигналу детектора, а относительный объем подвижной фазы, прошедшей через колонку, пропорционален времени прохождения подвижной фазы и кривая, графически представляющая уравнение (1.11) в координатах С/Сmax - является пиком, получаемым на хроматограмме.

Ширина гауссовой кривой распределения определяется стандартным отклонением *σ*, а ширина пика *ω* у основания треугольника, образованного касательными к фронту и тылу хроматографического пика и нулевой линией, равна *4σ*. Следовательно, полученная по хроматограмме величина *σ* может служить количественной мерой размывания полосы. Чем меньше *σ*, тем слабее размывание, тем больше пиков разделяемых веществ может разместиться на хроматограмме в определенном интервале времени, т. е. тем выше эффективность хроматографической колонки.

Если длину слоя сорбента в колонке (длину колонки) *L,* на которой осуществляется разделение смеси веществ и расположено некоторое число *N* теоретических тарелок, необходимое для разделения анализируемой смеси веществ, разделить на это число *N*, то получается величина *Н*, называемая высотой, эквивалентной одной теоретической тарелке (ВЭТТ):

(2.12)

Высота эквивалентной теоретической тарелки представляет собой толщину слоя сорбента, необходимую для установления равновесного распределения вещества между подвижной и неподвижной фазами.

Так как *ω=4σ*, экспериментально можно определить как дисперсию, приходящуюся на единицу длины колонки *L*, мм, непосредственно из хроматограммы, используя полученное на хроматограмме значение ширины пика *ω* у его основания для нахождения величины σ:

. (2.13)

Приняв время удерживания *tm* эквивалентом длины колонки, можно установить, что число теоретических тарелок *N* равно:

(2.14)

Хроматографическая колонка считается высокоэффективной, когда размывание полос небольшое, пики узкие, высота Н составляет 0,3- 0,4 мм. В идеальном случае величина Н приближается к диаметру *dp* зерна сорбента. При уменьшении значения Н максимумы на хроматограмме становятся более острыми.

Теория теоретических тарелок предоставляет возможность сравнить эффективность различных колонок, оценить качество сорбента и заполнения колонки. Но эта теория не позволяет выявить зависимость эффективности работы хроматографической колонки от скорости подачи подвижной фазы, природы и дисперсности сорбента, не может дать практических рекомендаций, позволяющих минимизировать размывание хроматографических пиков [3, c. 162-163].

**2.6 Кинетическая теория хроматографии**

Уширение хроматографических пиков обусловлено кинетическими явлениями, в частности, ограниченной скоростью процессов массопереноса в колонке. Величина уширения зависит от скорости движения подвижной фазы.

Рассмотрим экспериментальные зависимости ВЭТТ от линейной скорости подвижной фазы (см/с). Типичные зависимости для жидкостной и газовой хроматографии приведены на рис. 1.3. В таблице 1.1 приведены важнейшие величины, влияющие на эффективность колонки.

Н, мм Н, мм

*ǔ,* см/с *ǔ,* см/с

а) б)

Рисунок 2.3 – Зависимость высоты, эквивалентной теоретической тарелке Н от линейной скорости подвижной фазы *ǔ* для жидкостной (а) и газовой хроматографии (б)

Из рисунка 2.3 видно, что рассматриваемая зависимость в обоих случаях имеет вид кривой с максимумом. При этом для жидкостной хроматографии минимум лежит при значительно меньших скоростях подвижной фазы, чем для газовой. Величина ВЭТТ в жидкостной хроматографии также значительно меньше, чем в газовой. Однако в жидкостной хроматографии обычно применяют значительно более короткие колонки (25-30 см из-за ограничений, вызванных необходимостью работы при высоких давлениях), чем в газовой (до 50 м), поэтому числа теоретических тарелок в обоих методах оказываются сопоставимыми.

Для математического описания зависимости *Н* от *ǔ* было предложено много различных моделей. Самая ранняя из них, первоначально разработанная для технологических процессов и впоследствии примененная к хроматографии, описывается уравнением Ван-Деемтера:

*.* (2.15)

В уравнение Ван-Деемтера входит три константы – А, характеризующая вихревую диффузию, В, характеризующая молекулярную(продольную) диффузию, и С, характеризующая сопротивление массопереносу. Под *вихревой диффузией* понимается неравномерность движения отдельных потоков жидкости в колонке вследствие неравномерности ее заполнения.

Более точная модель зависимости Н от *ǔ* описывается уравнением

*Н = СМ + + Сsǔ* (2.16)

Константы , *СМ, Сs* характеризуют, соответственно, молекулярную диффузию и сопротивление массопереносу в подвижной и неподвижной фазах.

Уравнение (1.16), как и в уравнение Ван-Деемтера (1.15), описывает кривую с минимумом, соответствующим некоторой оптимальной скорости потока подвижной фазы. Слагаемое с коэффициентом В характеризует вклад молекулярной диффузии, т. е. диффузии отдельных частиц компонента от максимума его пика в направлении движения подвижной фазы и в противоположном направлении. Это единственное слагаемое, величина которого не зависит от размера частиц подвижной фазы. Она пропорциональна коэффициенту диффузии молекул вещества в подвижной фазе и возрастает с уменьшением его молярной массы. В жидкостной хроматографии для реально используемых там скоростей подвижной фазы это слагаемое обычно пренебрежимо мало.

С увеличением линейной скорости подвижной фазы влияние молекулярной диффузии уменьшается, а эффектов массопереноса – увеличивается. Последнее обстоятельство объясняется тем, что для переноса вещества между фазами и установления межфазного равновесия необходимо определенное время. Чем выше скорость подвижной фазы, тем большее расстояние она пройдет за это время.

Член, описывающий процессы массопереноса в подвижной фазе *СМ*характеризует комплексную составляющую размывания пика. Он соответствует члену, описывающему вихревую диффузию в уравнении Ван-Деемтера. Его величина обратно пропорциональна коэффициенту диффузии в подвижной фазе и связана с размером частиц неподвижной фазы и диаметром колонки.

Для слагаемого *Сsǔ,* характеризующего процессы массопереноса к неподвижной фазе и от нее, следует рассмотреть два случая: один для твердой, другой для иммобилизованной жидкой фазы.

Для жидкой неподвижной фазы преобладающим механизмом разделения является распределительный. В этом случае размывание пика увеличивается с увеличением толщины слоя иммобилизованной жидкости и уменьшением коэффициента диффузии в неподвижной фазе. Если же неподвижная фаза твердая, то скорость массопереноса определяется скоростью процессов адсорбции и десорбции.

В идеале при хроматографическом разделении всегда стремятся достичь высокой эффективности при малой продолжительности анализа. Это оказывается возможным, если зависимость *Н* от линейной скорости потока выражается достаточно пологой кривой. Для уменьшения величин ВЭТТ существуют следующие возможности:

* уменьшение размера частиц и толщины слоя иммобилизованной жидкости неподвижной фазы;
* увеличение однородности размеров частиц неподвижной фазы и упаковки колонки;
* уменьшение внутреннего диаметра колонок;
* использование неподвижных фаз с высокими коэффициентами диффузии и подвижных фаз с низкими коэффициентами диффузии.

Поскольку коэффициенты диффузии для различных молекул различаются, степень уширения пика зависит от молярной массы вещества. Для малых молекул размывание пиков, как правило, меньше [4, c. 15-20].

Хроматографическое разделение смеси веществ основано на селективности сорбента и различии в термодинамических свойствах хроматографируемых веществ в системе сорбент – элюент. Чтобы сделать заключение о возможности хроматографического разделения смеси на индивидуальные вещества, нужно сопоставить их хроматографические параметры – коэффициент селективности α и разрешение *Rs*.

Фактор разделения (коэффициент селективности) α есть мера относительного удерживания или относительной подвижности двух разделяемых веществ, и описывается уравнением:

= = , (2.17)

где - исправленное время удерживания соответственно веществ 1 и 2; – коэффициенты распределения; - коэффициенты емкости этих веществ.

Для разделения двух веществ необходимо подобрать условия разделения так, чтобы и α>1,00.

На хроматограмме пики компонентов могут иметь различный вид. Они могут быть расположены совершенно отдельно друг от друга или в большей или меньшей степени накладываться друг на друга.

Разделение двух соседних хроматографических пиков характеризуется разрешением *Rs*, которое описывается уравнением

(2.18)

где - ширина пиков у их основания.

Суммарное влияние основных параметров хроматографической колонки (эффективности, селективности и коэффициентов удерживания) на разрешение

хроматографических пиков описывается уравнением:

(2.19)

Для количественного разделения компонентов вполне достаточно, чтобы *Rs* имело значение от 1 до 1,5. При *Rs* = 1 перекрывается только 2% соседних пиков, при *Rs* = 1,5 два соседних пика разделены практически до базовой линии   
[1, с. 31-32].

**3 АППАРАТУРА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА**

**3.1 Общие положения**

Представленное на рынке приборов хроматографическое оборудование достаточно разнообразно, так как служит для выполнения различных задач и соответственно этим задачам имеет различную комплектацию.

Наиболее простыми являются хроматографы, предназначенные для проведения однотипных серийных анализов. Они имеют один детектор, термостат с колонкой и два блока управления - температурой и детектором.

Вторая группа хроматографов – универсальные приборы, которые отличаются тем, что укомплектованы несколькими детекторами, термостатирующими камерами большого объема, позволяющими использовать колонки различных типов и размеров. К приборам этого типа относится универсальный газовый хроматограф «Цвет», предназначенный для анализа веществ в любом агрегатном состоянии с температурой кипения до 450 ˚С.

Третья группа хроматографов – исследовательские приборы, отличающиеся широким диапазоном аналитических возможностей. Они оснащены 4-6 детекторами, которые могут работать одновременно. Такие приборы могут комплектоваться различными колонками и работать в изотермическом режиме и режиме программирования температуры. Результаты в таких приборах обрабатываются компьютером, и время удерживания компонентов анализируемых проб и площади хроматографических пиков могут быть получены в виде табличной распечатки. Все современные хроматографы укомплектованы обширным банком данных по характеристикам удерживания веществ различных классов на различных фазах, а также системами обработки полученных данных.

Как газовый, так и жидкостный аналитические хроматографы представляют собой совокупность взаимодействующих систем, предназначенных для проведения анализа в оптимальном режиме хроматографического разделения. Блок-схема прибора представлена на рис. 3.1 [1, c. 66-68].

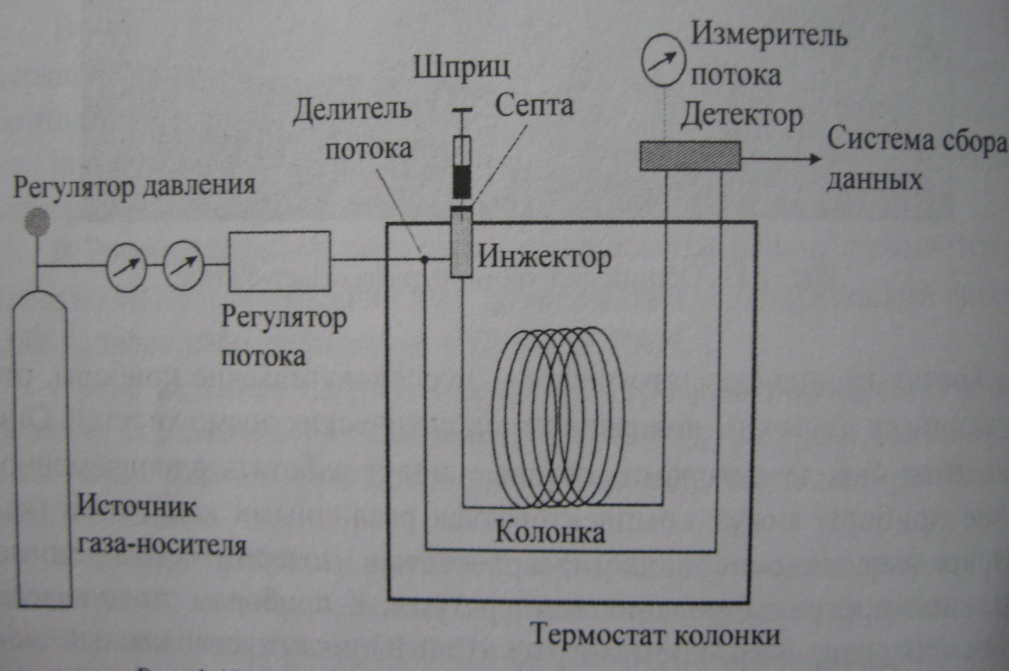
****

Рисунок 3.1 – Модульная схема газожидкостного хроматографа

**3.2 Дозаторы и устройства ввода проб в хроматографы**

Дозатор – это устройство для ввода в хроматографическую колонку газовой, жидкой или твердой анализируемой пробы. Наиболее распространено дозирование газообразных проб с помощью обычного медицинского шприца, жидких проб - посредством микрошприца, для дозирования твердых образцов применяют специальные ампулы из стекла или сплава Вуда, стеклянные лодочки и другие приспособления.

Для ввода пробы в каждом хроматографе есть специальное приспособление, которое установлено непосредственно у входа в хроматографическую колонку или вблизи её и представляет собой небольшую емкость, соединенную с началом хроматографической колонки и снабженную самоуплотняющейся термостойкой резиновой мембраной.

**3.3 Система подачи подвижной фазы**

Система подачи подвижной фазы в газовых хроматографах состоит из газового баллона, в котором под давлением находится газ, выбранный в качестве газа-носителя, системы вентилей и измерительных манометров, с помощью которой проводится регулировка и измерение давления газа в хроматографической колонке.

В жидкостном хроматографе эта система состоит из резервуаров с чистыми растворителями, резервуара для приготовления смешанной подвижной фазы, системы дегазации элюента и системы его подачи, а также насоса, который должен обеспечивать поток подвижной фазы со скоростями от нескольких микролитров в минуту для колонок малого диаметра до 10 мкл/мин для набивных колонок.

Разработаны модели с автоматизированной системой ввода пробы. На входе в колонку устанавливается дополнительный узел ввода пробы для дозирования порции анализируемого образца микрошрицем.

**3.4 Хроматографические колонки и термостаты**

Основной узел хроматографа **–** колонка, в которой непосредственно происходит разделение анализируемой пробы на компоненты. Корпус колонки для газовой хроматографии изготавливают из нержавеющей стали, стекла или высококачественного плавленого кварца; последний материал используется все шире. Колонки могут иметь различную форму. Наиболее распространенными являются прямые, U-образные и спиральные колонки. Основными типами колонок являются набивные (насадочные) и капиллярные.

Набивные колонки заполнены зернистым твердым материалом, поверхность которого покрыта тонким слоем жидкости – неподвижной фазой. Колонку заполняют через воронку. Внутренний диаметр набивных колонок составляет 3-8 мм, длина – до 1-3 м.

Капиллярные колонки внутри полые. Жидкую неподвижную фазу в этом случае наносят на внутренние стенки. Для этого через колонку медленно пропускают с постоянной скоростью достаточно концентрированный раствор неподвижной фазы либо заполняют ее разбавленным раствором неподвижной фазы, а затем испаряют растворитель в вакууме. Длина капиллярных колонок может составлять до 100 м, а

внутренний диаметр – 0,15-1 мм [4, c. 27-29].

**3.5** **Детекторы**

Детектор – это специальный блок хроматографической системы, реагирующий на различие с составе подвижной фазы, не содержащей компонентов разделяемой смеси, и подвижной фазы с разделенными компонентами, выходящими из колонки. Сигнал детектора после необходимого усиления подается на регистрацию пишущим потенциометром или компьютерными системами.

Результаты детектирования, а следовательно, и результаты всего анализа в значительной степени зависят от правильного выбора типа детектора, его конструкции. Принятая классификация детекторов позволяет правильно установить возможности и оптимальные варианты использования каждого из них.

В первую очередь принято подразделять детекторы на дифференциальные и интегральные. Дифференциальные детекторы реагируют на мгновенное значение одной из характеристик (концентрации или потока) во времени. Интегральные детекторы суммируют количество вещества за определенный промежуток времени. Дифференциальные детекторы, в свою очередь, подразделяют на два типа: концентрационные (регистрирующие изменение концентрации вещества на выходе из колонки) и потоковые (фиксирующие произведение концентрации вещества на скорость потока).

Иногда пользуются классификацией, основанной на характере процесса, лежащего в основе работы детектора. Так, различают детекторы химические, физико-химические, физические, биологические и др.

Классификация детекторов по их типу имеет принципиальное значение в связи с тем, что интенсивность возникающего в детекторе сигнала и форма его записи зависят от типа детектора. Так, форма записи сигнала интегрального детектора, регистрирующего общее количество вещества, прошедшего через детектор, получаемая в элюентном методе и выражаемая в координатах «время - сигнал», представляет собой ступенчатую кривую (рис. 3.2).

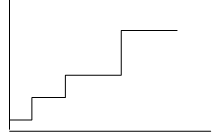
****Время

Рисунок 3.2 – Интегральная хроматограмма

В дифференциальных детекторах хроматограмма регистрируется в координатах «время - концентрация», причем получается кривая в виде хроматографического пика (рис. 3.3).

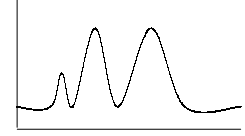
Время

Рисунок 3.3 – Дифференциальная хроматограмма

Детекторы подразделяют на селективные и универсальные. Универсальные детекторы реагируют на все соединения. Типичным примером таких детекторов является рефрактометр.

Селективные детекторы избирательно реагируют на конкретный тип соединений, которые имеют одно общее свойство, отсутствующее у других соединений, либо фиксируют изменение какого-либо свойства выходящего из колонки элюента, обусловленное наличием в нем анализируемых веществ. Это может быть изменение оптических свойств элюента в ИК-, УФ- или видимой области, его показателя преломления, способности флуоресцировать, окисляться и т. д [1, c. 74-80].

3.5.1 Детекторы, используемые в газовых хроматографах

Основные типы детекторов, применяемые в газовой хроматографии, приведены в таблице 3.1.

Таблица 3.1 – Детекторы, используемые в газовой хроматографии

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Название детектора | Селективность | Определяемые соединения |
| Термохимический | Селективный | Горючие вещества |
| Детектор по плотности газов | Универсальный | Соединения различной природы |
| Катарометр | Универсальный | Соединения различной природы |
| Пламенно-ионизационный (ПИД) | Универсальный | Горючие органическиесоединения |
| Термоионный детектор (ТИД) | Селективный | Азот- и фосфорсодержащие соединения |
| Фотоионизационный детектор (ФИД) | Универсальный | Соединения различной природы |
| Электронозахватный детектор (ЭЗД) | Селективный | Галогенсодержащие соединения |
| масс-спектрометрический детектор (МС) | Универсальный | Соединения различной природы |

Катарометр - детектор по теплопроводности, принцип работы которого основан на изменении температуры нагретых нитей (чувствительных элементов) в зависимости от теплопроводности окружающего газа, которая определяется его составом. Детектор измеряет различие в теплопроводности чистого газа-носителя и смеси газа-носителя с определяемым веществом. Чувствительность детектора определяется геометрическими характеристиками чувствительного элемента, электрическими параметрами чувствительного элемента и измерительного моста, теплопроводностью газа-носителя и анализируемого соединения. Для повышения чувствительности необходимо использовать газ-носитель с высокой электропроводность (водород, гелий).

Катарометр - достаточно простой, надежный в работе универсальный и потому наиболее распространенный в газовых хроматографах детектор. Однако из-за недостаточной чувствительности он, как правило, не может использоваться при определении микроколичеств вещества.

Похожими по конструкции являются детектор по плотности газов и детектор по теплоте сгорания (термохимический). В детекторе по плотности газов измерение основано на различии плотностей газа-носителя и компонентов анализируемой смеси. Чувствительность детектора зависит от разности плотностей, в качестве газа-носителя рекомендуют использовать воздух, азот, аргон, диоксид углерода, и не использовать водород и гелий. Достоинствами этого детектора являются:отсутствие необходимости градуировки; возможность использования для агрессивных и каталитически неустойчивых соединений; возможность использования для определения молекулярной массы анализируемых веществ. Получение сигнала детектора по теплоте сгорания основано на измерении теплового эффекта при сгорании компонентов анализируемой пробы в присутствии катализатора (платины). Он не нашел широкого применения из-за следующих недостатков: применим только для анализа горючих веществ; не применим в препаративной хроматографии; имеет ограниченный интервал определяемых концентраций - (0,1 - 5) % .

Наиболее широко используются *ионизационные детекторы,* принцип работы которых основан на изменении ионного тока, вызванного введением в детектор анализируемого вещества. Ионный ток возникает под действием источника ионизации и электрического поля между электродами детектора.

В качестве источников ионизации используют:

* пламена (пламенно-ионизационный детектор);
* электронную и ионную эмиссию (термоионный детектор);
* радиоактивные изотопы (детектор электронного захвата);
* электрический разряд;
* фотоионизацию (фотоионизационный детектор).

В любой момент времени в детекторе достигается равновесие, в результате которого скорость образования заряженных частиц (ионов и электронов) равна сумме скоростей рекомбинации и сбора заряженных частиц на электродах детектора. Создаются условия, при которых либо плотность (концентрация) заряженных частиц, либо скорость переноса частиц в электрическом поле зависит от состава газа в камере детектора.

Пламенно-ионизационный детектор *(ПИД)* - универсальный, чувствительный детектор, принцип действия которого основан на измерении электропроводности воздушно-водородного пламени, которая резко возрастает при попадании в него малых количеств органических веществ. При этом в пламени пиролиз вещества обеспечивает наличие радикалов СН•, которые по схеме

СН• + О — СНО+ + е--

обеспечивают протекание тока. Атомы кислорода галогенов, серы, фосфора и азота могут взаимодействовать как с углеводородными радикалами, так и с ионами СНО+, уменьшая ионизационный ток и, следовательно, сигнал детектора.

Отклик ПИД пропорционален числу атомов углерода в молекуле, причем этот отклик мало меняется при переходе от одного класса органических соединений к другому. Быстрый отклик, стабильность сигнала, широкий линейный диапазон сделали ПИД наиболее широко используемым в настоящее время газохроматографическим детектором, которым оснащены все хроматографы.

Термоионный детектор (ТИД) селективен к азот- и фосфорсодержащим соединениям и является модификацией пламенно-ионизационного детектора. Особенность этого детектора состоит в том, что вблизи водородного пламени горелки помещают соль щелочного металла (шарик, содержащий бромид рубидия). Нагретая соль атомизируется и образующиеся при этом атомы рубидия диссоциируют на ионы и электроны, которые попадают в электрическое поле. В присутствии соединения, содержащего галоген, азот или фосфор, ионный ток возрастает, т.е. происходит селективное повышение эффективности ионизации соединений содержащих атомы азота и фосфора. В их число входит множество чрезвычайно опасных загрязнителей среды -гербицидов, инсектицидов и фунгицидов.

Селективным и чувствительным детектором для определения галогенсодержащих соединений является электронозахватный детектор (ЭЗД). В детектор входит радиоактивный источник β-частиц, которые ионизируют молекулы газа-носителя, с образованием ионов и тепловых электронов, которые формируют электрический ток в камере детектора. Принцип действия этого детектора основан на уменьшении проводимости, вызываемом захватом электронов веществом, содержащим атомы с высокой электроотрицательностью.

Принцип действия фотоионизационного детектора (ФИД) заключается в ионизации молекул, элюируемых с хроматографической колонки под действием вакуумного УФ-излучения и измерении возникающего ионного тока. Изменяя энергию излучения, можно варьировать чувствительность детектирования соединений различных классов. Особенно низкий предел обнаружения у ФИД для ароматических углеводородов (при использовании лампы с энергией 10.2 эВ). Положительной особенность ФИД является то, что он не разрушает детектируемые соединения, и его можно использовать в комбинации с другими детекторами для более надежной идентификации сложных смесей.

Наиболее информативным и чувствительным детектором, используемым в газовой хроматографии, является масс-спектрометрический детектор. Принцип действия детектора основан на том, что при ионизации молекулы в вакууме образуется группа характеристических ионов. Число образующихся ионов пропорционально количеству поступающего вещества, регистрируется изменение полного ионного тока, который пропорционален числу ионов. Одновременно с записью хроматограммы (зависимости полного ионного тока от времени) в любой ее точке, обычно на вершине хроматографического пика, может быть зарегистрирован масс-спектр (зависимость интенсивности ионного тока от массы иона). Масс-спектрометр в отличие от других спектроскопических детекторов регистрирует не излучение или поглощение энергии молекулами или атомами вещества, а сами частицы вещества, измеряет их массы, вернее отношение массы к заряду. Таким образом, масс-спектрометрический детектор можно рассматривать как универсальный детектор, который позволяет определить состав анализируемой смеси и идентифицировать разделяемые компоненты   
[5, с. 16-21].

**3.5.2** Детекторы, используемые в жидкостных хроматографах

В жидкостных хроматографах применяются следующие детекторы: рефрактометрические, фотометрические, флуоресцентные, электрохимические, масс-спектрометрические, инфракрасные и некоторые другие.

В рефрактометре Френеля луч света падает на поверхность раздела двух оптических сред Количество света, отраженного от поверхности раздела двух фаз (жидкость/стекло), пропорционально разности показателей преломления и углу падения света на поверхность раздела. Если угол падения подобрать таким образом, чтобы угол проникания был -90° (т. е. близок к полному углу отражения), то небольшие изменения показателя преломления приведут к значительным изменениям интенсивности отраженного луча. Вместимость кювет составляет 3-5 мкл, т. е. возможна работа при небольших расходах элюента. Рефрактометр Френеля наиболее чувст­вителен к пульсациям потока, имеет меньший линейный диапазон. Высокие требования предъявляются к чистоте стекла.

В интерферометре коэффициент преломления измеряется методом интерференции света. Интерферометр имеет две проточные кюветы вместимостью 5 мкл. Чувствительность и линейный диапазон в несколько раз больше, чем у других моделей. Предел обнаружения составляет 3 мкг/мл.

Фотометрические детекторы подразделяют:

* на детекторы с фиксированной длиной волны;
* детекторы с длиной волны, дискретно изменяемой с помощью оптических фильтров;
* спектрофотометрические детекторы с плавно изменяемой длиной волны, предназначенные для регистрации поглощения в определенной области УФ-спектра;
* спектрофотометрические детекторы на фотодиодных линейках.

Фотометры с фиксированной длиной волны - наиболее дешевые и простые детекторы, применяемые в высоко эффективной жидкостной хроматографии для выполнения массовых анализов. Источником света в детекторах этого типа является ртутная лам­па низкого давления; детектирование проводится на длине волны   
253,7 нм, на которой излучается 90% излучения. Свет от источника излучения проходит через проточную ячейку, в которую из хроматографической колонки поступает поток элюента. Для аналитических колонок диаметром 4-6 мм, заполненных сорбентом с размером частиц 5-7 мкм, обычно используются ячейки с длиной оптического пути 10 мм, диаметром светового канала ~1 мм и рабочим объемом 8 мкл. Увеличение рабочего объема кюветы может привести к нежелательному размыванию хроматографических пиков.

Фотометрические детекторы с детектированием на длине волны, дискретно изменяемой с помощью оптических фильтров, отличаются от детекторов с фиксированной длиной волны источни­ком с широким спектром испускаемого излучения и тем, что для деления узкого диапазона длин волн, соответствующего максим поглощения детектируемых компонентов, используется набор стеклянных или интерференционных фильтров. Фотометрические детекторы этого типа более универсальны и чувствительны по сравнению с фотометрами с фиксированной длиной волны.

Спектрофотометр с перестраиваемой длиной волны (например, СПФ микроколоночного жидкостного хроматографа «Милихром-5») состоит из источника света, монохроматора и фотоприемника. В качестве источника света используется дейтериевая лампа ДДС-30 с непрерывным спектром испускаемого излучения от 190 до 600 нм. Необходимую спектральную линию, длина которой, как пра­вило, соответствует максимуму спектра поглощения определяемого компонента, выделяют с помощью либо дифракционных решеток, имеющих 1000-3000 штрихов на 1 мм, либо интерференционных фильтров с заданной шириной спектральной полосы. Монохроматический пучок света поочередно проходит через рабочую и сравнительную проточные кюветы, и измеряется оптическая плотность или пропускание излучения на выделенной длине волны.

Традиционные спектрофотометрические детекторы для ВЭЖХ позволяют осуществлять мониторинг элюируемых компонентов пробы по их максимумам поглощения. Сканирование спектра требует в большинстве случаев остановки потока и занимает несколько секунд или даже минут в зависимости от диапазона длин волн.

Электрохимические детекторы реагируют либо на изменение свойств элюента, либо на конкретное анализируемое соединение. К первому типу относится кондуктометрический детектор, ко второму -амперометрический. Большинство электрохимических детекторов работают в амперометрическом режиме, при котором поддерживается постоянное напряжение между двумя электродами погруженными в поток элюента, и регистрируется зависимость силы тока от времени.

Кондуктометрический детектор построен на том, что при создании разности потенциалов ионы, находящиеся в растворе, начинают перемещаться по направлению к электродам. Проводимость зависит от числа заряженных частиц в растворе - именно эта зависимость и положена в основу количественной оценки в кондуктомет-рии. Таким образом, для получения количественных результатов должна быть постоянной молярная проводимость. При применении детекторов этого типа следует избегать протекания электрохимических реакций на поверхности электродов, поэтому используют источники переменного тока с частотой от 50 до 1000 Гц и напряжением от 5 до 10 В. Измерения проводят с применением моста сопротивлений Уинстона.

Детекторы данного типа наиболее пригодны для определения заряженных соединений в элюате, предпочтительны при анализе малых концентраций ионов   
[1,с. 94-100].

Таким образом, в хроматогафии применяются различные типы детекторов.

**4 ОБЗОР НОРМАТИВНОЙ ДОКУМЕНТАЦИИ И ЛИТЕРАТУРЫ ДЛЯ АНАЛИЗА БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕД ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ**

**4.1 Общие положения**

В настоящее время разработаны хроматографические методе предназначенные для определения состава многих видов пищевой в промышленной продукции или установления содержания в них отдельных компонентов. Многие из этих методик гостированы и их применение регламентировано в качестве метода контроля показателей качества соответствующей продукции.

Таблица 4.1 – ТНПА на хроматографические методы анализа

|  |  |
| --- | --- |
| Обозначение | Название |
| СТБ 1181-99 | Продукты переработки плодов и овощей. Методики определения сорбиновой и бензойной кислот при их совместном присутствии спектрофотометрическим и хроматографическим методами [7] |
| СТБ ИСО 6468-2003 | Качество воды. Определение некоторых хлорорганических инсектицидов полихлорных бифенилов и хлорбензолов методом газовой хроматографии после экстракции жидкость-жидкость [8] |
| СТБ ГОСТ Р 51116-2002 | Комбикорма, зерно и продукты его переработки. Метод определения содержания дезоксиваленола (валитоксина) [9] |
| СТБ ГОСТ Р 51440-2008 | Сок яблочный, сок яблочный концентрированный и напитки, содержащие яблочный сок. Метод определения содержания патулина с помощью тонкослойной хроматографии [10] |
| СТБ ГОСТ Р 51698-2001 | Водка и спирт этиловый. Газохроматографический экспресс-метод определения содержания токсичных микропримесей [11] |
| ГОСТ 30669-2000 | Продукты переработки плодов и овощей. Газохроматографический метод определения содержания бензойной кислоты [12] |
| ГОСТ Р 51427-99 | Соки цитрусовые. Метод определения массовой концентрации гесперидина и нарингина с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии [13] |
| ГОСТ Р 51428-99 | Соки фруктовые. Метод определения содержания винной кислоты с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии [14] |
| ГОСТ Р 51435-99 | Сок яблочный, сок яблочный концентрированный и напитки, содержащие яблочный сок. Метод определения содержания патулина с помощью высокоэффективно жидкостной хроматографии [15] |

Продолжение таблицы 4.1

|  |  |
| --- | --- |
| 1 | 2 |
|  | Методика выполнения измерений концентрации дивинилбензола технического в воде методом газовой хроматографии |

Однако большинство хроматографических методик предназначено для определения в многокомпонентной пищевой или промышленной продукции содержания отдельных компонентов. К таким методикам относятся, например, методики определения в пищевых продуктах остаточных пестицидов, афлатоксинов, витаминов, отдельных жирных кислот, отдельных сахаров, насыщенных и ароматических углеводородов и многих других. Их особенностью является то, что ввиду многокомпонентности и сложности состава анализируемых продуктов на стадии подготовки пробы к анализу тем или иным способом, чаще всего жидкостной экстракцией, проводится выделение определяемого компонента, чистого или содержащего небольшое ко­личество примесей, из анализируемого продукта, а затем на хроматографической колонке осуществляется его качественная идентификация и количественное определение.

Во многих случаях для выделения определяемых компонентов и оптимизации условий хроматографирования приходится подвергать определяемые компоненты дополнительной обработке, позволяющей, например, отделить их от компонентов, мешающих определению или засоряющих хроматографическую колонку, или придать определяемым компонентам необходимые для хроматографирования свойства, например более высокую летучесть. Например, при хроматографическом определении насыщенных и ароматических углеводородов в продуктах животного и растительного происхождения, рыбопродуктах определяемые компоненты выделяют из неомыляемой фракции липидов, получаемой при обработке анализируемого образца спиртовым раствором щелочи, экстракцией гексаном. Затем экстракт разделяют на хроматографической колонке и углеводороды идентифицируют и количественно определяют с помощью газовой или высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Для газохроматографического определения сахаров - глюкозы, фруктозы, арабинозы, ксилозы, галактозы, сахарозы, мальтозы, лактозы, рафинозы, сорбита и инозита - в пищевых продуктах с целью повышения летучести сахаров анализируемые пробы обрабатывают триметилхлорсиланом или гексаметилдисилазаном в присутствии пиридина и трифторуксусной кислоты.

Применение хроматографии для анализа биологических сред достаточно быстро расширяется по мере оснащения производственных и испытательных лабораторий современным оборудованием [1, с. 118-120].

**3.2 Описание методики определения патулина в яблочных соках методом   
тонкослойной хроматографии (СТБ ГОСТ Р 51440-2006)**

СТБ ГОСТ Р 51440 устанавливает метод определения содержания патулина в яблочных соках, концентрированных яблочных соках и напитках, содержащих яблочный сок, с помощью тонкослойной хроматографии.

Предел обнаружения патулина данным методом составляет 25 мкг/дм3 при условии, что взятый для анализа объем пробы готового к употреблению сока составляет 50 см3.

**3.2.1 Сущность метода**

Сущность методики определения патулина в соках яблочных, концентрированых яблочных соках и напитках, содержащих яблочный сок, с помощью тонкослойной хроматографии по СТБ ГОСТ Р 51440-2006 (ИСО 8128-2-93)состоит в том, что патулин экстрагируют из исследуемой пробы смесью этилацетата с хлороформом (3:2 по объему).Далее экстракт очищают на колонке с силикагелем. Количественный и качественный анализ экстракта проводят с помощью двумерной тонкослойной хроматографии (ТСХ) при проявлении пятен раствором гидрохлорида гидразона   
3-метил-2-бензотиазолина (МБТГ).

Предел обнаружения патулина настоящим методом составляет 25 мкг/дм3 при условии, что взятый для анализа объем пробы готового к употреблению сока составляет 50 см3

**3.2.2 Реактивы**

Используют реактивы аналитической чистоты и воду квалификации «для хроматографии».

3.2.2.1 Растворители: этилацетат, хлороформ и толуол.

3.2.2.2 Подвижные фазы для двумерной ТСХ:

- бензол/метанол/уксусная кислота (массовой долей 80%) (19:2:1 по объему);

-толуол/этилацетат/муравьиная кислота (массовой долей 90%) (5:4:1 по   
объему).

3.2.2.3 Силикагель для колоночной хроматографии с размером частиц от 0,063 до 0,2 мм.

3.2.2.4 Элюирующий раствор: смесь толуола с этилацетатом (75:25 по объему).

3.2.2.5 Стандартный раствор патулина (С7Н604).

*3.2.2.5.1 Приготовление стандартного раствора патулина.*

Навеску патулина массой 10,0 мг, взятую с точностью до 0,1 мг, растворяют в

мерной колбе с одной отметкой вместимостью 100 см3 в этилацетате (1.3.2.1). Объем содержимого в колбе доводят до отметки этилацетатом.

Пипеткой переносят 10,0 см приготовленного раствора в другую мерную колбу с одной отметкой вместимостью 100 см, объем содержимого в колбе доводят до отметки этилацетатом.

Массовая концентрация патулина в приготовленном стандартном растворе составляет около 10 мкг/см3.

Измеряют оптическую плотность стандартного раствора при длине волны   
276 нм на подходящем спектрофотометре с использованием кварцевых кювет рабочей длиной 10 мм.

*3.2.2.5.2 Расчет концентрации стандартного раствора патулина*

Концентрацию стандартного раствора патулина ρps. мгк/см3, рассчитывают по формуле

ρps= (3.1)

где - оптическая плотность стандартного раствора патулина;

- молярный показатель поглощения раствора патулина при длине   
 волны 276 нм, дм3•моль-1 •см -1 (14600);

М - молярная масса патулина, г/моль;

С - постоянная прибора (обычно С = 1).

3.2.2.6 Приготовление раствора гидрохлорида МБТГ.

Навеску моногидрата гидрохлорида гидразона З-метил-2-бензотиазолина (МБТГ) массой 0,5 г растворяют в 100 см3 воды.

Приготовленный раствор хранят в холодильнике. Срок годности раствора -   
3 сут.

3.2.3 **Приборы и лабораторное оборудование**

Перед использованием лабораторное оборудование промывают раствором   
гипохлорита натрия концентрации 10 г/см3.

Лабораторное оборудование:

3.2.3.1 Хроматографическая колонка длиной 300 мм, внутренним диаметром   
22 мм, с резервуаром вместимостью 250 см и запорным краном, снабженная с выходного конца пористым стеклянным диском.

3.2.3.2 Оборудование для ТСХ: стеклянные хроматографические камеры, длинноволновая ультрафиолетовая лампа (360 нм) и устройство для опрыскивания.

3.2.3.3 Флюороденситометр.

3.2.3.4 Пластинки для ТСХ размером 20×20 см, покрытые силикагелем (1.3.2.3) толщиной слоя 0,25 мм, без флюоресцентного индикатора.

3.2.3.5 Сушильный шкаф с принудительной вентиляцией, пригодный для работы при (130 ± 1) °С.

3.2.4 Отбор проб

Проба, поступающая в лабораторию, должна быть представительной и без следов порчи или изменения свойств продукта при транспортировании и хранении.

**3.2.5** Проведение испытаний

3.2.5.1 Приготовление испытуемого раствора

При испытании концентрированных яблочных соков их разводят водой 1:5 по объему. Дальнейшую процедуру проводят для всех продуктов одинаково, как описано ниже.

Пробу объемом 50 см3 экстрагируют порцией смеси этилацетата с хлороформом (3:2 по объему) объемом 50 см3 в течение не менее 1 мин. Экстракцию повторяют еще два раза той же смесью новыми порциями объемом по 60 см3. Экстракты объединяют и фильтруют на воронке с пористым стеклянным фильтром через слой безводного сульфата натрия толщиной 1 см, фильтрат собирают в отгонную колбу

вместимостью 250 см3.

Экстракт упаривают не ротационном испарителе под вакуумом досуха, остаток количественно переносят в мерный цилиндр вместимостью 100 см3 , ополаскивая колбу четырьмя порциями этилацетата объемом по 5 см3. Объем содержимого в цилиндре доводят сначала до 25 см3 этилацетатом, затем до 100 см3 толуолом.

3.2.5.2 Колоночная хроматография

В основание колонки (3.2.3.1) помещают ватный тампон. В колонку вносят   
25 см3 толуола и суспензию 15 г силикагеля (3.2.2.1) в 40 см3 толуола. После оседания силикагеля в колонку вносят 15 г безводного сульфата натрия и дают растворителю стечь до верхней кромки насыпного слоя. В колонку вносят экстракт из исследуемой пробы, после чего растворителю дают стечь до верхней кромки насыпного слоя, элюат отбрасывают. В колонку вносят 200 см3 элюирующего раствора (3.2.2.4) и проводят элюирование при скорости потока около 5 см3/мин, элюат собирают в градуированный цилиндр. Собранный элюат упаривают приблизительно до объема   
2 см3.

Сконцентрированный элюат количественно переносят в пробирку вместимостью 20 см3 с помощью четырех порций этилацетата объемом около 4 см3 каждая и упаривают досуха в токе азота. Остаток немедленно растворяют в 0,5 см3 этилацетата, так как патулин не стабилен.

3.2.5.3 Тонкослойная хроматография

Пластинки для ТСХ, предварительно покрытые силикагелем (3.2.2.1), активируют при температуре 110 °С в течение 2 ч. С помощью капиллярной пипетки или микрошприца на пластинку в точку, находящуюся на расстоянии 2 см от левого края и 2 см от нижнего края, наносят аликвотную часть очищенного экстракта из пробы (3.2.5.2) объемом 0,020 см3. В точку, находящуюся на расстоянии 2 см от правого края и 2 см от нижнего края пластинки, наносят 0,005 см3 стандартного раствора патулина (3.2.5.1). В точку, находящуюся на расстоянии 2 см от левого края и 2 см от верхнего края пластинки, наносят также 0,005 см3 стандартного раствора патулина. В точку, находящуюся на расстоянии 2 см от левого края пластинки и 4 см от верхнего края пластинки, наносят 0,010 см3 стандартного раствора патулина (см. рисунок 3.1). Хроматограмму развивают в направлении I (рисунок 3.1), используя подвижную фазу бензол/метанол/уксусная кислота (3.2.2.2), до прохождения фронтом растворителя расстояния 14 см. Пластинку вынимают из камеры, высушивают на воздухе, после чего развивают хроматограмму в направлении II (рисунок 1), используя подвижную фазу толуол/этилацетат/муравьиная кислоте (3.2.2.2), до прохождения фронтом растворителя расстояния 14 см. Пластинку вынимают из камеры и высушивают при комнатной температуре. Пластинку опрыскивают раствором гидрохлорида МБТГ (3.2.2.6), после чего высушивают в течение 15 мин в сушильном шкафу (3.2.3.5) при температуре 130 ˚С.

Направление II

2 12 2 2 2

**Направление** I

20×20 2 12 4 2

Рисунок 3.1 - Двумерная тонкослойная хроматография

**3.2.6** **Определение количества патулина** в экстракте

Количество патулина в экстракте определяют сравнением интенсивности флюоресценции пятна патулина из экстракта с пятнами патулина из стандартного раствора при облучении пластинки длинноволновым ультрафиолетовым светом. Пятно патулина из экстракта ищут на пересечении перпендикулярных линий, соединяющих пятна патулина из стандартного раствора. Если интенсивность флуоресценции пятна патулина из 0,020 см3 экстракта выше интенсивности флюоресценции пятен патулина из стандартного раствора, экстракт разводят этилацетатом и повторяют процедуру ТСХ-анализа по 3.2.3.5.2. Если интенсивность флуоресценции пятна патулина из экстракта сравнима с интенсивностью флюоресценции одного из пятен патулина из стандартного раствора, то концентрация патулина в анализируемой пробе составляет 25 мкг/дм3 либо 50 мкг/дм3 соответственно.

При проведении анализа описанным методом достигается полное отделение патулина от оксиметилфурфурола (ОМФ), поэтому последний не влияет на результаты анализа.

3.2.7 Обработка результатов

Содержание патулина в продукте ρр, мкг/дм3, вычисляют по формуле

, (3.2)

где V0 — конечный объем, до которого доведен очищенный экстракт, см3;  
 V1  - объем экстракта из пробы, нанесенный на пластинку, см3;

V2 - объем стандартного раствора патулина (3.2.2.5), соответствующий пятну той же интенсивности флюоресценции, что и пятно патулина из экстракта, см3; ρps - концентрация патулина в стандартном растворе, мкг/см3 ;

50 - объем пробы, взятый для экстракции, см3.

**3.2**.8 Точность метода

3.2.8.1 Сходимость результатов

*r* = 33,4 мкг/дм3; Sr = 29,4 мкг/дм3,

где *r* - предел сходимости;

S2 - среднее квадратическое отклонение сходимости.

3.2.8.2 Воспроизводимость результатов

R = 41,0 мкг/дм3; Sr = 35,8 мкг/дм3.

где R - предел воспроизводимости;

Sr - среднее квадратическое отклонение воспроизводимости.

**3.2.**9 Протокол испытаний

В протоколе испытаний указывают.

* метод испытаний;
* результат испытаний;

- окончательный результат с оценкой сходимости, если была проверена сходимость результатов.

Также следует отметить особенности проведения испытаний, не указанные в стандарте или рассматриваемые как несущественные, с побочными обстоятельствами, способными повлиять на результат испытаний.

Протокол испытаний должен содержать информацию, необходимую для полной идентификации образца [5].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

**Список использованной литературы**

**1** Глоба, И. И. Хроматографические и спектральные методы анализа: учеб. пособие для студентов специальности «Физико-химические методы и приборы контроля качества продукции» и химико-технологических специальностей /   
И. И. Глоба, С. А. Ламоткин. – Минск: БГТУ, 2008. – 352 с.

**2** Хроматографические методы анализа // Хроматография [Электронный ресурс]. – 2010. – Режим доступа: http: //www.eurolab.ru/hromatograficheskie\_meto-dy\_analisa.html. – Дата доступа: 15.03.2010.

**3** Васильев, В. П. Теоретические основы физико-химические методов анализа: учеб. пособие / В. П. Васильев. – Минск: Высш. шк., 1978. – 182 с.

**4** Отто, М. Современные методы аналитической химии (в 2-х томах). Т. 2 /   
М. Отто. – Москва: Техносфера, 2004. – 288 с.

**5** Шаповалова, Е. Н. Хроматографические методы анализа: методическое пособие для специального курса / Е. Н. Шаповалова, А. В. Пирогов; под. ред. О. А. Шпигуна. – Москва: МГУ им. Ломоносова, 2007. – 205 с.

6

**7** Продукты переработки плодов и овощей. Методики определения сорбиновой и бензойной кислот при их совместном присутствии спектрофотометрическим и хроматографическим методами: СТБ 1181-99. - Введ.01.03.2000. – Минск, 2000. –

13 с.

**8** Качество воды. Определение некоторых хлорорганических инсектицидов полихлорных бифенилов и хлорбензолов методом газовой хроматографии после экстракции жидкость-жидкость: СТБ ИСО 6468-2003. – Введ. 01.05.2004. – Минск:   
БелГИСС, 2004. – 26 с.

**9** Комбикорма, зерно и продукты его переработки. Метод определения содержания дезоксиваленола (валитоксина): СТБ ГОСТ Р 51116-2002. – Введ. 01.01.2003. – Минск: БелГИСС, 2003. – 8 с.

**10** Сок яблочный, сок яблочный концентрированный и напитки, содержащие яблочный сок. Метод определения содержания патулина с помощью тонкослойной хроматографии: СТБ ГОСТ Р 51440-2006. – Введ.01.06.2007. – Минск:   
БелГИСС,2007. – 5 с.

**11** Водка и спирт этиловый. Газохроматографический экспресс-метод определения содержания токсичных микропримесей: СТБ ГОСТ Р 51698-2001. – Введ. 01.01.2001. – Минск: БелГИСС,2001. – 10 с.

**12** Продукты переработки плодов и овощей. Газохроматографический метод определения содержания бензойной кислоты: ГОСТ 30699-2000. – Введ. 01.11.2000. -

Минск: БелГИСС,2000. – 7 с.

**13** Соки цитрусовые. Метод определения массовой концентрации гесперидина и нарингина с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии:  
ГОСТ Р 51427-99. – Введ. 01.01.2001. – Москва: Издательство стандартов, 2002. – 7 с.

**14** Соки фруктовые. Метод определения содержания винной кислоты с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии: ГОСТ Р 51428-99. – Введ. 01.01.01. – Москва: Издательство стандартов, 2002. – 7 с.