

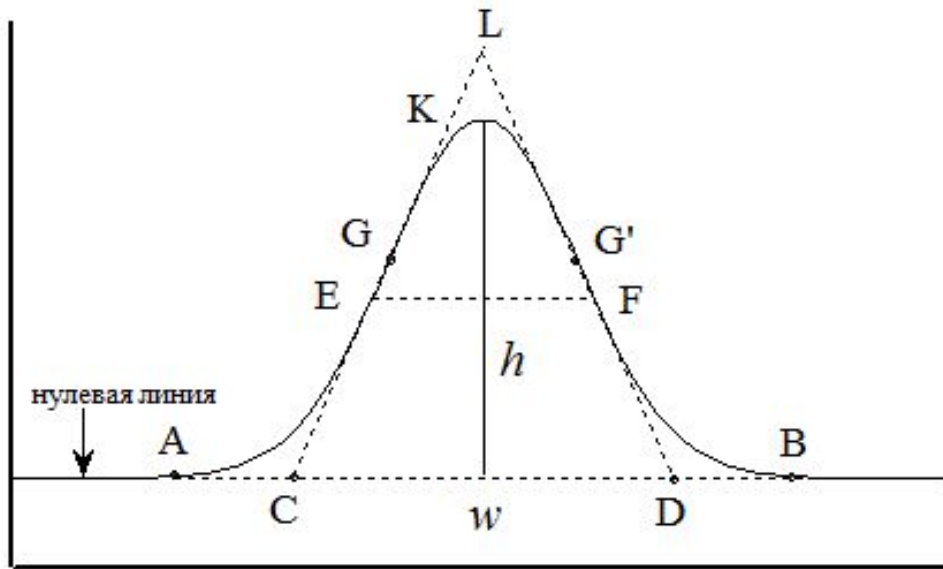
Лекция 8

# КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИ Й АНАЛИЗ

# Основные количественные параметры хроматографических пиков

## 1. Площадь пика ( $A/S$ )

Участок выходной хроматографической кривой, ограниченный контуром  $AЕКFВ$  и продолжением нулевой линии  $АВ$



## 2. Высота пика ( $h$ )

Отрезок  $WK$ , отвечающий максимальной амплитуде сигнала детектора

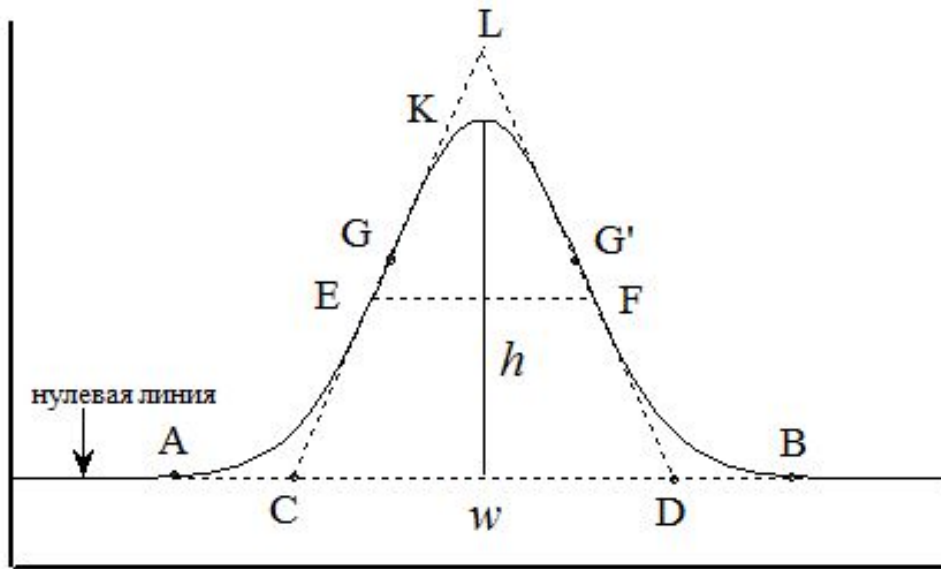
## 3. Произведение высот пиков на время удерживания ( $h \cdot t_R$ )

Для тех случаев, когда ширина пика изменяется пропорционально времени удерживания

# Вспомогательные количественные параметры хроматографических пиков

## 1. Высота пика ( $h'$ )

*Высота треугольника  $CLD$ , образуемого касательными к ветвям пика в точках перегиба*



## 2. Ширина пика у основания ( $\mu_B$ )

*Отрезок  $CD$ , отсекаемый на продолжении базовой линии касательными к ветвям пика*

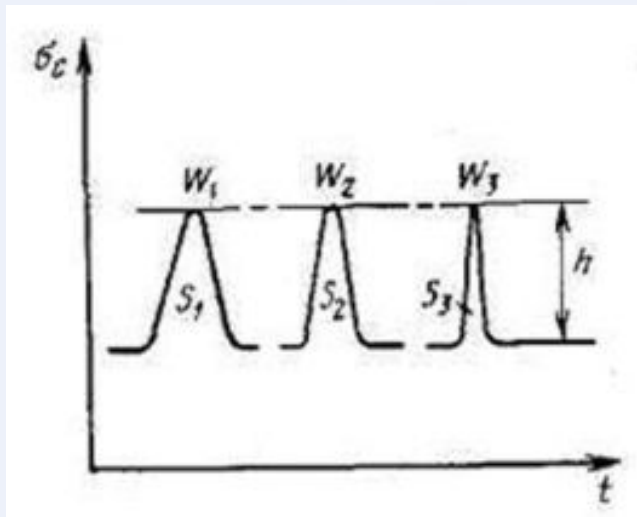
## 3. Ширина пика на половине высоты (полуширина пика) ( $\mu_{0.5}$ )

*Определяется как расстояние между ветвями пика на заданном сечении высоты (на половине высоты)*

# Выбор основных количественных параметров хроматографических пиков

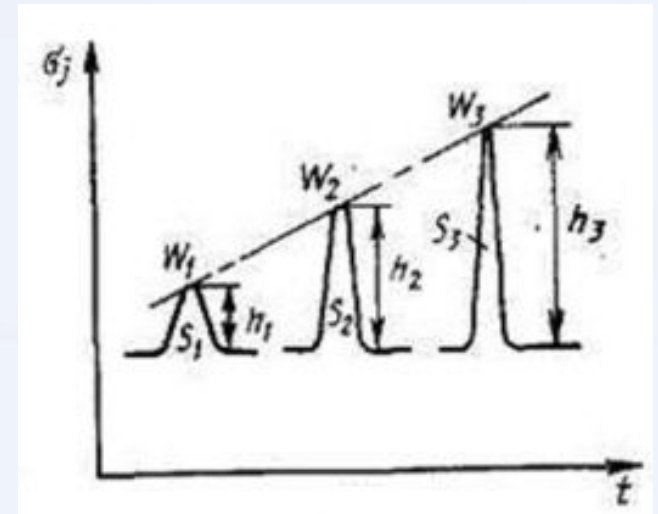
## 1. Свойства детектора

### Концентрационный детектор



Изменение расхода ПФ приводит к изменению площадей пиков

### Потоковый детектор



С повышением скорости ПФ площадь пика не изменяется, а высота увеличивается

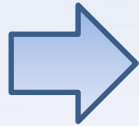
$W$  – скорость движения ПФ

$$W_1 < W_2 < W_3$$

# Выбор основных количественных параметров хроматографических пиков

## 2. Температура колонки

Измерение  
площадей пиков



Мало проявляется

Измерение  
высот пиков



Сильно проявляется



**Нельзя использовать высоты в качестве количественных параметров хроматографического пика в режиме программирования температуры**

# Выбор основных количественных параметров хроматографических пиков

## 3. Природа, состав и количество НФ

Колонки истощаются вследствие уноса НФ. Интенсивность уноса зависит от упругости паров НФ при рабочей температуре колонки и от жесткости задаваемого температурного режима.

За 2000 ч работы улетучивается 50 % общей массы НФ



За 1 день – унос около 0.2 % НФ



Высота пиков будет увеличиваться на 0.2 % в день



Прогрессирующее завышение результатов

# Выбор основных количественных параметров хроматографических пиков

**Вопрос о предпочтительном использовании при количественной расшифровке хроматограмм высот пиков, площадей или произведения высоты на время удерживания должен решать сам хроматографист после тщательного всестороннего анализа аппаратных возможностей, вида хроматограмм и допустимой погрешности определения**

**! Первостепенная задача: градуировка прибора, т.е. установление строгой числовой зависимости между сигналом детектора и количеством определяемого вещества.**

**Метод абсолютной градуировки (внешнего стандарта)**

**Суть метода Использование зависимости одного из количественных параметров хроматографического пика ( $S$ ,  $h$ ,  $h \cdot t_R$ ) от содержания вещества в пробе**

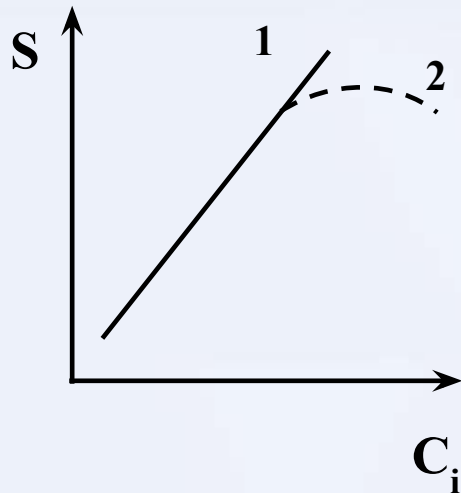


# Методы количественного анализа.

## Метод абсолютной градуировки

### Варианты расчета

#### 1. По градуировочному графику



1 – линейно работающий хроматограф

2 – нелинейно работающий хроматограф

$C_i$  – массовое или объёмное содержание *i*-го вещества в пробе (в %) или его абсолютное количество (в см<sup>3</sup>, мкл, мкг)

#### 2. По уравнению градуировочного графика

#### 3. Сравнение с одним эталоном (по пропорции)

### 4. С применением калибровочных коэффициентов

$$K_i = \frac{q_i}{R_i}$$

$q_i$  - масса компонента

$R_i$  - параметр пика ( $S$ ,  $h$ ,  $h \cdot t_R$ )

Содержание компонента в пробе рассчитывают как

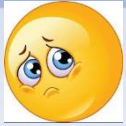
$$C_i = \frac{q_i}{Q} \cdot 100\% = \frac{k_i \cdot R_i}{Q} \cdot 100\%$$

$k_i$  - усредненное значение калибровочного коэффициента

$Q$  - масса пробы, введенной в колонку

### Методика проведения анализа

- 1. Готовят модельные смеси тех компонентов, содержание которых необходимо определить в контрольной пробе.**
- 2. Хроматографируют модельную смесь:**
  - если смесь одна, то меняют объём пробы;**
  - если объём пробы постоянен, то используют несколько смесей с различной концентрацией компонентов.**
- 3. Рассчитывают калибровочные коэффициенты для определяемых компонентов.**
- 4. Хроматографируют контрольную пробу.**
- 5. Рассчитывают содержание компонентов в контрольной пробе.**



### Недостатки метода абсолютной градуировки

- 1. Необходимость точной и воспроизводимой дозировки пробы.**
- 2. Строгое соблюдение постоянства условий хроматографирования при градуировке прибора и при анализе контрольной пробы.**
- 3. Высокая степень чистоты реагентов и растворителей, используемых для приготовления модельных смесей.**
- 4. Концентрации компонентов в модельных смесях должны перекрывать ожидаемую концентрацию в контрольной смеси.**

# Методы количественного анализа

## Метод абсолютной градуировки



### Область применения

1. Если есть сомнения в линейной работе детектора.
2. При анализе примесей, т.е. когда надо определить не все компоненты смеси.

### Метод внутренней нормализации

Суть метода заключается в отнесении измеренного параметра хроматографического пика ( $S$ ,  $h$ ,  $h \cdot t_R$ ) к суммарному сигналу детектора на все компоненты пробы, присутствующие в образце.

### Варианты расчета

#### 1. Простая нормализация

Концентрация компонентов рассчитывается как относительная площадь:

$$C_i = \frac{S_i}{\sum S_i} \cdot 100\%$$

- Условия:
- регистрация всех компонентов пробы
  - одинаковая чувствительность детектора к разным веществам (если молекулярная масса веществ близка).

### 2. Основной вариант

$$C_i = \frac{K_i \cdot S_i}{\sum K_i \cdot S_i} \cdot 100\%$$

$K_i$  – калибровочный коэффициент. Его рассчитывают как:

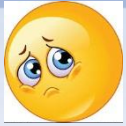
$$K_i = \frac{C_i \cdot S_{ст}}{C_{ст} \cdot S_i}$$

ст – это стандартный компонент, элюируемый первым



### Методика проведения анализа

- 1. Готовят модельную смесь компонентов идентичного качественного состава, что и контрольная смесь.**
- 2. Хроматографируют модельную смесь, определяют калибровочные коэффициенты.**
- 3. Хроматографируют контрольную смесь с неизвестным количественным составом компонентов.**
- 4. Вычисляют концентрации компонентов в контрольной смеси.**



### Недостатки метода внутренней нормализации

- 1. Трудность разделения всех компонентов сложной смеси.**
- 2. Необходимость идентификации всех компонентов смеси.**
- 3. Трудоёмкость определения всех калибровочных коэффициентов.**
- 4. Погрешности как на стадии хроматографирования, так и на стадии приготовления модельных смесей.**
- 5. Взаимозависимость точности определения одного компонента от точности определения всех компонентов, присутствующих в смеси.**
- 6. Необходимость линейного детектирования.**

# Методы количественного анализа

## Метод внутренней нормализации



### Преимущества метода внутренней нормализации

1. Нет необходимости в точном дозировании образца.
2. Нет необходимости в соблюдении тождественности условий анализа при повторных определениях.



### Область применения

1. Рутинный анализ малокомпонентных смесей.
2. Для проведения приблизительных расчетов.

### Метод внутреннего стандарта

**Суть метода** заключается в прибавлении к известному количеству анализируемого образца известного количества не содержащегося в нём эталонного соединения (внутреннего стандарта) и последующем хроматографировании приготовленной смеси.

$$C_i = \frac{R_i \cdot K_i \cdot q_{\text{ст}}}{R_{\text{ст}} \cdot q_{\text{см}}} \cdot 100\%$$

$R_i$ ,  $R_{\text{ст}}$  – параметры хроматографических пиков определяемого и стандартного вещества

$K_i$  – калибровочный коэффициент

$q_{\text{ст}}$ ,  $q_{\text{см}}$  – количество стандартного вещества и анализируемой смеси (мг, мкл, ммоль)

### Методика проведения анализа

1. Получают хроматограммы пробы и стандартного вещества.
2. Составляют смеси из определяемого и стандартного веществ.
3. Хроматографируют смеси, определяют калибровочные коэффициенты:

$$K_i = \frac{q_i \cdot R_{ст}}{q_{ст} \cdot R_i}$$

4. К точной навеске пробы прибавляют точную навеску внутреннего стандарта, хроматографируют смесь.
5. Определяют содержание определяемого вещества.



### Требования к внутреннему стандарту

1. **Полная смешиваемость с компонентами анализируемой смеси.**
2. **Химическая инертность по отношению к компонентам пробы, ПФ, НФ, адсорбенту.**
3. **Близость по структуре и молекулярной массе к анализируемому компоненту.**
4. **Концентрацию стандарта подбирают таким образом, чтобы  $R_{ст} / R_i \approx 1$**
5. **Близость к пику определяемого соединения на хроматограмме.**
6. **Отсутствие таких примесей, пики которых накладывались бы на пики определяемого компонента.**

# Методы количественного анализа

## Метод внутреннего стандарта



### Недостатки метода внутреннего стандарта

1. **Необходимость в специальной подготовке пробы для анализа.**
2. **Трудности при выборе стандарта.**



### Преимущества метода внутреннего стандарта

1. **Минимум погрешности из-за случайных изменений параметров хроматографического опыта.**
2. **Нет необходимости в точном дозировании пробы и соблюдении всех переменных параметров хроматографирования.**
3. **Важно, чтобы стандарт и анализируемое соединение разделялись на хроматограмме. Остальные компоненты могут разделяться не полностью.**
4. **Нет необходимости в предварительной идентификации веществ.**

# Методы количественного анализа

## Метод внутреннего стандарта



### Область применения

1. При анализе некоторых компонентов смеси.
2. При использовании селективных детекторов (когда не все компоненты регистрируются).
3. Когда компоненты пробы частично испаряются.
4. При анализе жидкостей.



# Методы количественного анализа

## Метод стандартной добавки

### Метод стандартной добавки

Суть метода В качестве стандарта используют соединения, содержащиеся в смеси, или даже сам определяемый компонент.

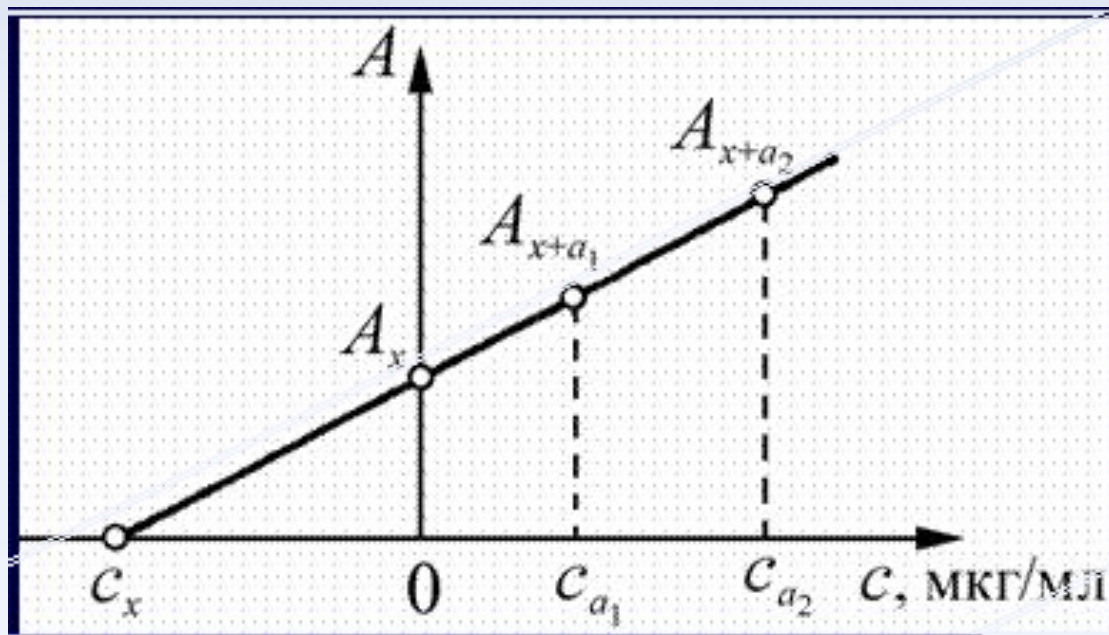
### Методика проведения анализа

В одинаковых условиях получают две серии хроматограмм:

- исходной анализируемой смеси
- порции смеси с добавленным к ней известным количеством одного из компонентов, играющего роль стандартного соединения
- определяют содержание компонентов

# Методы количественного анализа

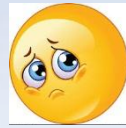
## Метод стандартной добавки



К нескольким одинаковым навескам анализируемой смеси добавляют известные последовательно увеличиваемые количества определяемого вещества.

# Методы количественного анализа

## Метод стандартной добавки



### Недостатки

1. **Необходима линейная работа детектора.**
2. **Необходим стабильный режим работы всех систем хроматографа.**
3. **Возрастающая продолжительность проведения анализов.**



### Преимущества

1. **Большая точность.**
2. **Простота выполнения.**
3. **Не требует знания калибровочных коэффициентов.**



### Область применения

**В случае, если выбор вещества-стандарта затруднён.**

