

Документ подписан простой электронной подписью

Информация о владельце:

ФИО: Локтионова Оксана Геннадьевна

Должность: проректор по учебной работе

Дата подписания: 04.05.2022 21:55:17

Уникальный программный ключ:

Уникальный программный ключ:

00817ca911e6668ab015a5d426d39e5f1c11eabb175e945d4a48511da56d089

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Юго-Западный государственный университет»

Кафедра фундаментальной химии и химической технологии



Методы жидкостной хроматографии

Методические указания к выполнению лабораторных работ по дисциплине «Аналитическая химия», «Аналитическая химия и ФХМА» для студентов 2 курса по направлению подготовки 04.03.01 Химия, 18.03.01 Химическая технология, 28.03.01 Нанотехнологии и микросистемная техника.

Курск 2017

УДК 543.21

Составители: Н.А. Борщ

Рецензент

Кандидат химических наук, доцент кафедры
«Фундаментальная химия и химическая технология»
С.Д. Пожидаева

Методы жидкостной хроматографии: методические указания к выполнению лабораторных работ по дисциплине «Аналитическая химия», «Аналитическая химия и ФХМА» для студентов 2 курса по направлению подготовки 04.03.01 Химия, 18.03.01 Химическая технология, 28.03.01 Нанотехнологии и микросистемная техника. /Юго-Зап. гос. ун-т; сост.: Н.А. Борщ. Курск, 2017. 39 с.: Библиогр.: с. 7.

Приведены основы теории и техники жидкостной хроматографии, а также лабораторные методики, закрепляющие полученные сведения на практике.

Предназначены для студентов 2 курса, обучающихся по направлению подготовки «Аналитическая химия», «Аналитическая химия и ФХМА» для студентов 2 курса по направлению подготовки 04.03.01 Химия, 18.03.01 Химическая технология, 28.03.01 Нанотехнологии и микросистемная техника очной формы обучения.

Текст печатается в авторской редакции

Подписано в печать

Формат 60x84 1/16

Усл. печ. л. Уч.-изд. л. Тираж 30 экз. Заказ Бесплатно.
Юго-Западный государственный университет.
305040, г. Курск, ул. 50 лет Октября, 94.

СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
Введение	4
Особенности выполнения хроматографического анализа	5
Лабораторная работа №1. Определение красителя кислотного фиолетового в чернилах	13
Лабораторная работа №2. Концентрирование методом ТСХ и флуориметрическое определение родамина 6Ж в технологических растворах и сточных водах.....	15
Лабораторная работа №3. Разделение и идентификация многоатомных спиртов	17
Лабораторная работа №4. Разделение и обнаружение катионов Hg(II), Cd(II), Pb(II), Cu(II) методом ТСХ	18
Лабораторная работа №5. Обнаружение примеси карбонильных соединений в капролактаме	20
Лабораторная работа №6. Разделение и идентификация природных липидов	26
Лабораторная работа №7. Обнаружение и идентификация кофеина, тиофилина и тиобромина в растительных экстрактах	28
Лабораторная работа №8. Обнаружение и идентификация антибиотиков и алкалоидов в различных субстратах полу-количествоенным методом	29
Лабораторная работа №9. Обнаружение бензола, нафталина и антрацена в их смеси методом обращенно-фазовой ВЭЖХ	31
Лабораторная работа №10. Использование метода обращенно-фазовой ВЭЖХ для определения фальсификации кофе	32
Лабораторная работа №11. Использование градиентного элюирования при анализе нефтепродуктов	34
Контрольные вопросы.....	36
Библиографический список	38

ВВЕДЕНИЕ

Условия проведения лабораторных работ:

1. Предварительное ознакомление с правилами техники безопасности в химической лаборатории.
2. Предварительная защита теоретической части для получения допуска на выполнение работы.
3. Лабораторная работа оформляется в тетради для лабораторных работ.
4. Оформленные экспериментальные результаты лабораторной работы подтверждаются подписью преподавателя.
5. После проведения и оформления лабораторной работы обязательна ее защита.

Хроматографические методы широко применяются в различных отраслях промышленности и научных исследованиях для анализа смеси газообразных, жидких и твердых веществ, preparativного выделения соединений и для изучения физико-химических свойств газов и растворов.

Хроматография — это динамический сорбционный метод разделения смесей веществ, основанный на многократном распределении веществ между двумя фазами, одна из которых неподвижная, а другая — подвижная, непрерывно перемещающаяся вдоль неподвижной фазы.

В данных методических указаниях представлены работы по жидкостному варианту хроматографического анализа. Согласно классификации хроматографических методов по агрегатному состоянию фаз все методы, использующие в качестве подвижной фазы жидкость, относят к жидкостной хроматографии (ЖХ). В пределах этой группы выделяют колоночную и плоскостную хроматографию. К последней относятся бумажный и тонкослойный варианты.

Методы жидкостной хроматографии находят широкое применение в научных исследованиях и технологиях, в таких областях, как химия, нефтехимия, биология, медицина, пищевая промышленность, охрана окружающей среды и во многих других. Применение в жидкостной хроматографии в качестве элюента

жидкости позволяет анализировать смеси практически всех растворимых веществ, в том числе и тех, которые не могут быть проанализированы методом газовой хроматографии из-за их высоких температур кипения. Другой особенностью ЖХ является возможность использования большего числа параметров при оптимизации условий разделения за счет реализации взаимодействия молекул разделяемых веществ не только с неподвижной фазой (как в газовой хроматографии), но и с подвижной фазой. Наконец, разделение в ЖХ проводят при низких температурах (20—60 °C), что иногда улучшает разделение.

Выполнение лабораторных работ, приведенных в данных методических указаниях, позволит студенту освоить перспективный, широко распространенный в наше время метод анализа. Различные варианты исполнения жидкостной хроматографии дают возможность улучшить разделение веществ, повысить эффективность и селективность метода.

Особенности выполнения хроматографического анализа

Плоскостная хроматография

Одним из вариантов жидкостной хроматографии, различающихся по технике исполнения и аппаратурному оформлению хроматографического процесса, является плоскостная хроматография. Плоскостная хроматография объединяет два родственных метода — бумажную и тонкослойную хроматографию.

Бумажная хроматография

Хроматографическая бумага. Хроматографическую бумагу изготавливают из высококачественного хлопка, т. е. из практически чистой α -целлюлозы (до 98 %). Древесину в качестве исходного сырья не применяют, так как при длительной переработке ее и очистке получаются короткие и хаотично расположенные волокна бумаги. Хроматографическая бумага должна представлять собой длинные, ориентированные в определенном направлении волокна. В этом случае нанесенная на бумагу жидкость перемещается по капиллярам, образуемым волокнами хроматографической бумаги. Наиболее четкое и

воспроизводимое разделение достигается в том случае, когда направление движения подвижной фазы совпадает с направлением волокон бумаги. Хроматографическая бумага должна отвечать следующим требованиям:

- 1) быть химически чистой, для чего ее предварительно обрабатывают растворами минеральных кислот, щелочей или ацетоном и спиртами, которые вымывают различные органические и неорганические примеси;
- 2) быть химически и адсорбционно инертной по отношению к разделяемым веществам и подвижной фазе;
- 3) быть однородной по плотности и толщине; чем плотнее бумага, тем медленнее скорость движения зон по ней, но тем большее количество вещества можно разделить (сорбционная емкость бумаги выше);
- 4) иметь длинные и определенным образом ориентированные волокна.

Типы хроматограмм. В зависимости от направления движения подвижной фазы различают несколько способов получения хроматограмм: восходящий и нисходящий, линейные способы, круговой, электрофоретический, двумерный и др.

В восходящем варианте разделения лист хроматографической бумаги опускают в подвижную фазу ниже линии старта и за счет капиллярных сил подвижная фаза перемещается вверх по вертикально закрепленному листу. Из-за действия силы тяжести растворитель, как правило, не поднимается выше 20—22 см. Поскольку длина пробега подвижной фазы в этом случае невелика, то восходящий вариант применяют для разделения веществ с большим различием величин R_f . В нисходящем варианте бумага верхним концом погружается в подвижную фазу и подвижная фаза под действием силы тяжести и капиллярных сил движется сверху вниз. В этом случае длина пробега подвижной фазы не ограничена и можно разделять смеси веществ с близкими значениями R_f . Если подвижная фаза движется в одном направлении, то получают одномерную хроматограмму.

На одномерной хроматограмме в одной подвижной фазе не всегда можно разделить сложную смесь веществ — тогда

применяют двумерный вариант бумажной хроматографии. Для этого подвижную фазу пропускают в одном направлении, достигая группового разделения, т. е. получают зоны, состоящие из нескольких веществ, затем лист бумаги высушивают, поворачивают на 90° и погружают в другую подвижную фазу, где происходит разделение пятен, не полностью разделившихся в первом направлении движения.

Круговые хроматограммы получают при радиальном перемещении растворителя по плоскости листа бумажной хроматограммы, в центр которого, сверху или снизу, непрерывно подается подвижная фаза. Разделяемые вещества на круговой хроматограмме располагаются концентрическими полосами. Для круговой хроматограммы применимо следующее соотношение: $Rf_{\text{круг.}} = \sqrt{Rf_{\text{лин.}}}$

Хроматографирование проводят в хроматографической камере, в качестве которой можно применить любой сосуд с герметической крышкой, чтобы не происходило испарения растворителя, которое может привести к нежелательному изменению состава одной или обеих фаз. Таким сосудом может быть цилиндр, узкий стакан, эксикатор, чашка Петри (для круговой хроматографии). Внутрь камеры вставляют держатель или подставку-стойку для полоски хроматографической бумаги и небольшую емкость для подвижной фазы. Анализируемый раствор наносят на стартовую линию (расположенную на расстоянии ~ 1 см от нижнего края бумаги) в объеме не более 5—10 мкл с помощью микропипетки, калиброванного капилляра или микрошприца. Чем меньше площадь стартового пятна, тем менее размытой будет зона вещества после хроматографирования. Поэтому пробу смеси веществ объемом более 1 мкл наносят в одну и ту же точку повторно в несколько приемов, каждый раз подсушивая пятно. Подсушивать пятно над нагревательными приборами надо осторожно, чтобы не удалить из пор хроматографической бумаги неподвижную фазу. Во время хроматографирования нельзя открывать крышку сосуда, чтобы не сместить равновесие между фазами. После развития хроматограмм их сушат под тягой в специальном шкафу в токе теплого воздуха или под инфракрасной лампой. После высушивания приступают к обнаружению и идентификации пятен.

Качественный и количественный анализ. Если хроматографируемые вещества окрашены, то зоны их наблюдаются визуально. Если зоны бесцветны, то их обнаруживают на полоске бумаги следующими приемами. Проявляют хроматограмму раствором-проявителем, который дает с определяемым веществом окрашенный продукт реакции. Проявитель наносят путем распыления с помощью пульверизатора. Очень часто хроматограмму помещают в пары йода (в закрытый сосуд), который окрашивает органические веществами в желтый, коричневый или чернильно-синий цвет.

Для проявления неорганических ионов, например Fe^{3+} и Co^{2+} , на хроматограмму распыляют 10 %-ный раствор роданида аммония в ацетоне, при этом зона железа окрашивается в красно-коричневый цвет, кобальта — в синий вследствие образования комплексных роданидных ионов этих элементов. Иногда реактив наносят на хроматограмму кисточкой, если требуется проявление на ограниченном участке бумаги.

Бесцветные вещества можно обнаружить при воздействии ультрафиолетовых лучей по возникновению их собственной флуоресценции или путем обработки их каким-либо реагентом, дающим специфическую флуоресцентную реакцию (флуоресцируют продукты реакции). Чтобы получить флуоресценцию, полоску бумаги помещают в ультрафиолетовый свет ртутной лампы.

Тонкослойная хроматография (ТСХ)

Тонкослойная хроматография — широко распространенный вариант жидкостной хроматографии, отличающийся от колоночной хроматографии по форме неподвижной фазы и способу перемещения подвижной фазы, а также по технике исполнения и аппаратурному оформлению хроматографического процесса. В ТСХ процесс разделения происходит в слое тонкодисперсного сорбента, нанесенного на стеклянную, полимерную или металлическую пластинку. Толщина такого слоя во много раз меньше его длины или ширины. Именно поэтому вместе с бумажной хроматографией ТСХ относят к плоскостным хроматографическим методам. В отличие от колоночной хрома-

тографии в ТСХ время движения по слою неподвижной фазы (или время пребывания в хроматографической системе) одинаково для всех компонентов хроматографируемой смеси. При этом скорость элюирования не постоянна, а уменьшается (функция квадрата времени в случае линейной ТСХ) до некоторого значения, определяемого свойствами фаз.

Выбор хроматографической системы. Выбор неподвижной и подвижной фаз определяется прежде всего природой разделяемых веществ, которая обусловливает их хроматографические свойства. Наиболее универсальными сорбентами для адсорбционной ТСХ, пригодными для разделения самых разнообразных соединений, являются силикагель и оксид алюминия. Применение находят и другие сорбенты: целлюлоза, полиамид, кизельгур, а также смешанные сорбенты и неполярные сорбенты на основе химически модифицированных кремнеземов.

Как и в бумажной хроматографии, основной качественной характеристикой вещества в ТСХ служит величина R_f . По расположению хроматографической зоны на хроматограмме можно судить о присутствии того или иного компонента в анализируемой смеси, при этом используют табличное значение R_f определяемого соединения или сравнивают найденную величину R_f с величиной R_f соответствующим образом подобранного вещества - «свидетеля» (стандарта). Для получения величины R_f как индивидуальной характеристики данного вещества большое значение имеет воспроизводимость условий разделения. Поэтому такие параметры, как качество и чистота сорбента и растворителей, температура, влажность, степень насыщения камеры парами подвижной фазы, толщина слоя и другие, влияющие на воспроизводимость значений R_f , по возможности, необходимо поддерживать постоянными.

Основные операции в методе ТСХ. Методика разделения и определения веществ в ТСХ включает следующие основные стадии:

- 1) нанесение пробы анализируемой смеси на слой сорбента;
- 2) разделение компонентов анализируемой смеси на отдельные зоны в потоке подвижной фазы;
- 3) обнаружение зон на слое сорбента;

4) количественная оценка — измерение соответствующих величин удерживания и определение содержания веществ в зонах.

По технике эксперимента и используемому оборудованию ТСХ близка к хроматографии на бумаге. Способы нанесения пятен образцов, развития хроматограмм и обнаружения веществ такие же, как и в рассмотренном выше способе.

Колоночный вариант жидкостной хроматографии

Сорбенты и элюенты. В адсорбционной ЖХ в зависимости от полярности подвижной и неподвижной фаз различают два варианта метода: нормально-фазный и обращенно-фазный. В нормально-фазном варианте хроматографии применяют полярные сорбенты (силикагель, оксид алюминия), неполярные подвижные фазы (гексан) и разделяют полярные вещества.

Особенно широко в нормально-фазном варианте хроматографии применяют сорбенты на основе силикагеля. Силикагель — аморфное вещество. Подкислением раствора силиката натрия получают золь кремниевой кислоты $\text{SiO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, в процессе старения которого осуществляется его поликонденсация с образованием конгломератов с большой удельной поверхностью, пронизанных капиллярами (порами). На поверхности гранул и в порах находятся в большом количестве гидроксильные группы, которые обеспечивают, с одной стороны, гидрофильность силикагеля, с другой — адсорбцию полярных веществ за счет водородных связей или диполь-дипольного взаимодействия. Введение различных функциональных групп, например $-\text{CN}$, $-\text{NO}_2$, $-\text{NH}_2$, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, позволяет изменить свойства и селективность силикагелей.

При выборе подвижного растворителя необходимо учитывать не только его транспортную функцию, но и возможность взаимодействия с растворенным веществом. В первом приближении элюирующую силу растворителя определяет его полярность: в нормально-фазном варианте с увеличением полярности растворителя его элюирующая сила возрастает. Чем больше элюирующая сила подвижного растворителя, тем меньше фактор емкости сорбента для вещества на данном сорбенте. Все растворители в порядке увеличения их элюирующей силы

(возрастания полярности) можно расположить в так называемый элюотропный ряд. В начале этого ряда находится н-пентан, хроматографическая полярность которого $p = 0$, и заканчиваются водой с $p = 10.2$. Часто применяют смеси растворителей (гексан-хлороформ, гексан-метиленхлорид и т. д.), позволяющие регулировать элюирующую силу подвижной фазы при различном соотношении компонентов.

Метод нормально-фазовой хроматографии позволяет разделять многие полярные вещества. Особенно высокая селективность достигается при разделении пространственных изомеров, в частности, орто-, мета-, пара-изомеров ароматических соединений.

В обращенно-фазной адсорбционной хроматографии применяют неполярные сорбенты, полярные элюенты и разделяют соединения с неполярными группами, которые сорбируются на поверхности неполярного сорбента. Эффективным неполярным, гидрофобным сорбентом является силикагель, химически модифицированный хлорсиланом. Такой силикагель содержит вместо поверхностных гидроксильных групп эфирную сильную группу. Это так называемые привитые сорбенты.

В качестве адсорбентов в обращено-фазовом варианте жидкостной хроматографии применяют силикагели, на поверхности которых привиты углеводородные радикалы, содержащие 8, 16 или 18 атомов углерода. Названия адсорбентов C_8 , C_{16} , C_{18} соответствуют привитым на силикагеле углеводородным цепочкам длиной 8, 16, 18 углеродных атомов. Наиболее неполярными свойствами обладают C_{16} и C_{18} .

В России распространены следующие обращено-фазовые адсорбенты: Силасорб C_{18} , Силасорб SPH C_{18} , Сепарон SGX C_{18} , Нуклеосил C_{18} , Диасорб 130 C_{16} Т.

В качестве элюента в обращено-фазной хроматографии применяют такие сильнополярные растворители, как вода или вода с добавлением спиртов, ацетонитрил. В этом случае с увеличением полярности подвижной фазы элюирующая сила растворителя уменьшается.

Элюенты для ОФ ВЭЖХ располагаются в элюотропный ряд в соответствии с увеличением элюирующей силы.

Таблица 1
Элюотропный ряд для ОФ ВЭЖХ

Растворитель	Элюирующая сила
Вода	
Метанол	
Ацетонитрил	
2-пропанол	
Тетрагидрофуран	
Хлороформ	

↓

В обращено-фазовом варианте ВЭЖХ применяются в основном водно-метанольные, водно-ацетонитрильные или водно-ацетонитрильно-метанольные смеси. 2-Пропанол, тетрагидрофуран и хлороформ используются значительно реже.

В настоящее время обращенно-фазный вариант применяют в ВЭЖХ гораздо чаще, чем нормально-фазный благодаря устойчивости сорбентов с привитыми неполярными группами к действию растворителей, воды, pH, температуры. Важными достоинствами являются быстрое установление равновесия при смене элюента и возможность изменять в широких пределах селективность за счет изменения типа и степени модификации сорбента и подвижной фазы. Варьируя подвижную и неподвижную фазы, можно разделять практически все вещества.

Особенно эффективно применение в обращено-фазной хроматографии градиентного элюирования, т. е. постепенного изменения состава растворителя в ходе хроматографирования, что позволяет элюировать из колонки как слабо-, так и сильноудерживаемые вещества с хорошим разделением за короткое время анализа.

Таким образом, варьируя разные параметры, оптимизируя их, обеспечивают минимальные затраты на разработку хроматографических методик. На практике для достижения эффективной работы колонки используют два пути: 1) используют один сорбент, и изменяют состав элюента; 2) используют один элюент, и изменяют природу сорбента. Во втором случае воспроизводимость и стабильность показаний выше.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1

Определение красителя кислотного фиолетового С в чернилах

Разделение фиолетовых чернил "Радуга-2" на красители кислотный ярко-красный и кислотный фиолетовый С основано на различии их коэффициентов распределения между подвижной и неподвижной фазами. Кислотный фиолетовый С перемещается вместе с фронтом растворителя. Содержание этого красителя определяют, выделяя его экстракцией, с последующим фотометрированием по собственной окраске.

Цель работы: освоить методику разделения красителей методом бумажной хроматографии.

Вариант 1

Используемые реагенты и методики их приготовления

1. Подвижная фаза: смесь н-бутилового спирта, уксусной кислоты, воды (5:5:4, по объему).
2. Анализируемый раствор: фиолетовые чернила "Радуга-2", раствор, разбавленный в соотношении 1:3.
3. Хроматографическая бумага марки "С", круг диаметром 12 см.

Методика выполнения анализа

На круг хроматографической бумаги накладывают шаблон и простым карандашом очерчивают линию фронта. В два противоположных сектора микрошприцем в 2-3 приема в одну и ту же точку на стартовой линии наносят по 4 мкл раствора чернил. После каждого нанесения пробы пятну дают подсохнуть. Диаметр пятна не должен превышать 3 мм, и пятна ни в коем случае не должно касаться границ секторов.

Из квадрата обычной фильтровальной бумаги сворачивают конус, с помощью канцелярской булавки скрепляют его и ровно обрезают широкую часть конуса. Вершину конуса вставляют снизу в отверстие круга и круг (с конусом) помещают в эксикатор строго горизонтально таким образом, чтобы край круга лежал на

внутреннем выступе эксикатора, а основание конуса было погружено в подвижную фазу, находящуюся в чашке на дне эксикатора. Движение растворителя и зон компонентов происходит от центра к периферии.

Развитие хроматограммы останавливают, когда фронт растворителя достигнет очерченной линии финиша. Хроматограмму извлекают из эксикатора пинцетом и помещают для высушивания в бокс под тягу.

После высушивания хроматограммы измеряют величину R_f для красителей.

Вариант 2

В этом варианте работы изучают элюирующую способность смешанных растворителей относительно разделения фиолетовых чернил на компоненты, выбирают поводящий растворитель и количественно определяют краситель кислотный фиолетовый С.

Используемые реактивы и методики их приготовления

1. Раствор фиолетовых чернил, разбавленный в соотношении 1:3.

2. Подвижная фаза: 1) смесь н-бутилового спирта, уксусной кислоты, воды (5:5:4); 2) смесь н-бутилового спирта, уксусной кислоты, воды (5:1:3); 3) смесь н-бутилового спирта, уксусной кислоты.

3. Хроматографическая бумага марки "Средняя"-3, круг диаметром 12 см.

Методика выполнения анализа

На круг хроматографической бумаги накладывают шаблон и простым карандашом очерчивают линию фронта. В четыре сектора с помощью микрокапилляра в 2-3 приема в одну и ту же точку на стартовой линии наносят пробу раствора чернил. После каждого нанесения пробы пятну дают подсохнуть.

Из квадрата обычной фильтровальной бумаги сворачивают конус и с помощью канцелярской булавки скрепляют его. Вершину конуса вставляют снизу в отверстие круга. Круг (с конусом)

помещают в эксикатор строго горизонтально таким образом, чтобы край круга лежал на внутреннем выступе эксикатора, а основание конуса было погружено в подвижный растворитель, находящийся в чашке на дне эксикатора.

Движение растворителя и зон компонентов происходит от центра к периферии. Развитие хроматограмм останавливают, когда фронт растворителя дойдет до очерченной линии финиша. Хроматограммы извлекают из эксикатора пинцетом и помещают для высушивания в бокс под тягу.

После высушивания хроматограмм определяют, в каком растворителе произошло наилучшее разделение.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2

Концентрирование методом ТСХ и флуориметрическое определение родамина 6Ж в технологических растворах и сточных водах

Краситель родамин 6Ж интенсивно поглощает в УФ области спектра и характеризуется молекулярным типом свечения. Флуориметрическое определение родамина 6Ж в технологических растворах и сточных водах затрудняется присутствием органических соединений. Для выделения из смеси и концентрирования родамина 6Ж используют метод ТСХ.

Цель работы: 1) изучить влияние концентрации ацетона в подвижной фазе на эффективность хроматографического концентрирования родамина 6Ж; 2) исследовать влияние концентрации родамина 6Ж на эффективность его хроматографического концентрирования.

Используемые реактивы и методики их приготовления

1. Подвижные фазы: а) смесь бутилового спирта, уксусной кислоты, воды (4:1:5); б) смесь бутилового спирта, ацетона, уксусной кислоты, воды в объемных соотношениях 4:1:1:5, 4:2:1:5, 4:3:1:5.

2. Раствор -"свидетель": ацетоновый раствор родамина 6Ж с концентрацией 10 мкг/мл.

3. Рабочий раствор для флуориметрического определения, содержащий 0.4 мкг/мл родамина 6Ж.

4. ТСХ-пластинки.

Методика выполнения анализа

Выбор условий концентрирования. Анализируемый раствор и раствор-«свидетель» хроматографируют, используя подвижные фазы а) и б). Зону родамина 6Ж находят по его желто-розовой окраске.

На стартовую линию хроматографической пластиинки наносят разные объемы (от 1 до 5 мкл) стандартного раствора родамина 6Ж в ацетоне. Для получения хроматограммы используют выбранную подвижную фазу.

Концентрирование родамина 6Ж. Пробы анализируемого раствора наносят микрошприцем на ТСХ-пластинки в виде близко расположенных зон (общий объем 50 мкл) и проводят хроматографирование. Соскабливают зону родамина и элюируют его в мерную колбу, промывая слой сорбента несколько раз горячей дистиллированной водой до полного обесцвечивания промывных вод. Раствор разбавляют водой до метки.

Флуориметрическое определение родамина 6Ж. Из рабочего раствора готовят шесть стандартных растворов с содержанием родамина 6Ж 0.008; 0.016; 0.024; 0.032; 0.040; 0.048 мкг/мл. Для этого 1.0; 2.0; 3.0; 4.0; 5.0; 6.0 мл исходного раствора родамина 6Ж вносят в мерные колбы вместимостью 50 мл и доводят объемы растворов в каждой колбе до метки дистиллированной водой. Измеряют интенсивность флуоресценции (3-5 раз). В качестве первичного светофильтра применяют светофильтр В-1 или ФК-1, вторичного — В-2 (желтый светофильтр). По средним значениям интенсивностей строят градуировочный график в координатах «интенсивность флуоресценции — концентрация родамина 6Ж».

Измеряют (3-5 раз) интенсивность флуоресценции раствора после концентрирования, по среднему ее значению находят концентрацию родамина 6Ж, используя градуировочный график. Рассчитывают его содержание в анализируемом растворе, учитывая объем раствора, используемый для концентрирования, и объем мерной колбы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3

Разделение и идентификация многоатомных спиртов

Тонкослойная хроматография позволяет разделять многие органические соединения в пределах оного класса, а именно: кислоты, альдегиды, спирты, аминокислоты и т.д. Для этого необходимо подобрать соответствующий сорбент и элюент, обеспечивающий максимальное разделение смеси.

В настоящее время описано применение большого количества различных элюентов для разделения близких по природе органических веществ, причем с использованием различных типов сорбентов.

Цель работы: научиться разделять и идентифицировать глицерин, этиленгликоль и 1,2 - пропиленгликоль методом тонкослойной хроматографии.

Используемые реагенты и методики их приготовления

1. Многоатомные спирты: этиленгликоль, глицерин, 1,2-пропиленгликоль.
2. Подвижная фаза, состоящая из смеси хлороформа, ацетона и 5М водного раствора аммиака (10:80:10).
3. Проявляющий раствор – аммиачный раствор нитрата серебра. Готовят смешением 9 объемов 5%-ного раствора нитрата серебра и 1 объема 25%-ного раствора аммиака.
4. Пластинки для ТСХ с силикагелем в качестве неподвижной фазы.

Методика выполнения анализа

Для разделения и идентификации спиртов используют хроматографирование со "свидетелями". На стартовую линию на пластинке наносят раствор, содержащий приблизительно 5 % трехатомного и 10 % двухатомного спиртов, диаметр пятен на старте не должен превышать 2 мм. На расстоянии 1 см от пятна с анализируемым раствором наносят пятна 5 %-ных растворов "свидетелей", в качестве которых используют чистые вещества, предположительно содержащиеся в анализируемой пробе.

Пластиинку помещают в хроматографическую камеру с элюентом, таким образом, чтобы уровень подвижной фазы был ниже стартовой линии.

По завершении хроматографирования пластиинку вынимают из камеры, сушат и опрыскивают раствором проявителя. Снова сушат при 100 °С в течение 15-20 мин. Многоатомные спирты, содержащие не менее двух свободных гидроксильных групп, дают темно-коричневые или коричнево-черные пятна на желто-коричневом фоне.

В качестве проявителя можно использовать пары йода. Для этого высушенную пластиинку помещают в закрытую камеру с кристаллами йода.

Проявившиеся пятна обводят простым карандашом и рассчитывают величины R_f по формуле: $R_f = l/L$, где, l - расстояние от линии старта до центра пятна, мм; L - расстояние, пройденное фронтом растворителя, мм.

Полученные величины R_f сравнивают со стандартными величинами, приведенными в табл. 2.

Таблица 2

Величины R_f некоторых многоатомных спиртов

Спирт	R_f
Глицерин	0.35
Этиленгликоль	0.70
1,2-Пропиленгликоль	0.85

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4

Разделение и обнаружение катионов $Hg^{(II)}$, $Cd^{(II)}$, $Pb^{(II)}$, $Cu^{(II)}$ методом ТСХ

Цель работы: научиться разделять и определять некоторые катионы с помощью ТСХ.

Используемые реагенты и методики их приготовления

1. Водорастворимые соли ионов $Hg^{(II)}$, $Cd^{(II)}$, $Pb^{(II)}$, $Cu^{(II)}$.

2. Проявитель: 2%-ный раствор КІ, 10 %-ный $(\text{NH}_4)_2\text{S}$.
3. Подвижная фаза - 100 мл н-бутанола, 20 мл 1.5 М НС1 и 0.5 мл ацетилацетона, который способствует лучшему формированию пятен, уменьшению «хвостов».
4. ТСХ пластиинки (силифол).
5. Растворитель для исследуемых соединений: дистиллированная вода.

Методика выполнения анализа

На пластиинке с готовым слоем сорбента (силифол) простым карандашом проводят стартовую линию на расстоянии 2 см от нижнего края. На стартовую линию наносят тонким капилляром пробу исследуемого раствора и пробы индивидуальных компонентов, входящих в состав смеси (стандарты или «свидетели»): по 2 мкл 0.1 М растворов Hg (II), Cd (II), Pb (II), Cu (II) и т.д. Расстояние между каплями должно быть не менее 1 см. Для надежности идентификации компонентов капли подсушивают.

Пластиинку вертикально помещают в камеру для хроматографирования, снабженную притертой крышкой. Нижний край ее погружают в растворитель не более, чем на 5 мм. Хроматографирование продолжают до тех пор, пока эллюенте поднимется на расстояние 0.5-1 см от верхнего края пластиинки. После этого пластиинку вынимают, отмечают линию фронта, тщательно подсушивают над песочной баней или электрической плиткой.

Для обнаружения пятен хроматограмму вначале опрыскивают 2 % раствором КІ, высушивают, держат над парами концентрированного аммиака, затем обрабатывают 10 % $(\text{NH}_4)_2\text{S}$. Появление характерной окраски пятен подтверждает наличие катиона в исследуемой смеси (табл. 3). Место обнаружения пятна отмечают и рассчитывают R_f . Пятна на хроматограмме располагаются по уменьшению R_f в следующем ряду: Hg (II) > Cd (II) > Pb (II) > Cu (II).

Таблица 3
Окраска пятен на хроматограмме

Катион	Проявитель	Окраска пятна
Hg (II)	KI	Красная
Hg (II)	(NH ₄) ₂ S	Коричнево-черная
Cd (II)	KI	Бесцветная
Cd (II)	(NH ₄) ₂ S	Желтая
Pb (II)	KI	Желтая
Pb (II)	(NH ₄) ₂ S	Коричневая
Cu (II)	KI	Коричневая
Cu (II)	(NH ₄) ₂ S	Темно-коричневая

ЛАБАРАТОРНАЯ РАБОТА № 5
**ОБНАРУЖЕНИЕ ПРИМЕСИ КАРБОНИЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ
В КАПРОЛАКТАМЕ**

Цель работы: ознакомить практически с возможностями ВЭЖХ для определения микропримесей на примере анализа капролактама – мономера, применяемого в производстве полиамидных волокон и нитей; освоить приемы реакционной хроматографии и жидкостной экстракции для концентрирования микропримесей карбонильных соединений; провести анализ образца промышленного капролактама на присутствие карбонильных соединений.

Используемое оборудование и реактивы

1. Работа проводится на жидкостном хроматографе марки «Милихром - 5» со стальной колонкой 5x80 мм, заполненной сорбентом «Силасорб-600». Включают хроматограф в сеть и прогревают его в течение 30 мин, в это же время пропускают подвижную фазу через колонку для ее кондиционирования.
2. Микрошиприц объемом 10 мкл.
3. Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ 24104-88.
4. Колба коническая вместимостью 100 см³.

5. Гексан ч., ТУ 6-09-3375-78, перегнанный; диоксан ч., ГОСТ 10455-82, перегнанный; хлороформ, ГОСТ 3160-78; 2,4-динитрофенилгидразин (ТУ 6-09-2394-72); диметилтерефталат (МРТУ 6-09-3687-67); соляная кислота с концентрацией 2 моль/л; кислота серная концентрированная (ГОСТ 4204-66); вода дистиллированная (ГОСТ 4204-66) .

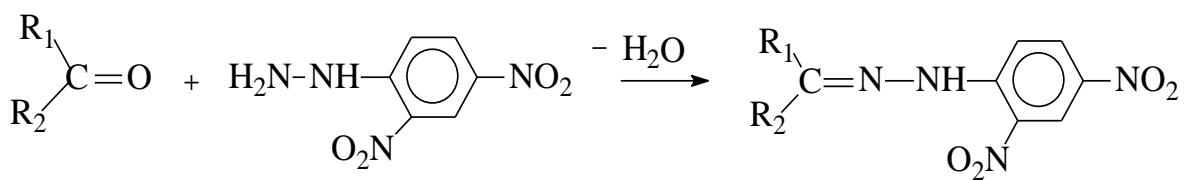
Теоретические основы методики

Анализ сложных смесей органических соединений, физические и химические свойства компонентов которых различаются незначительно и многие из которых находятся в исследуемых пробах в следовых концентрациях, – одна из основных проблем современной аналитической химии. Поэтому основными методами в аналитической органической химии являются хроматографические методы разделения, и среди них особое место занимает современная высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). В сочетании с методами концентрирования и высокочувствительными детекторами ВЭЖХ позволяет обнаруживать следовые количества органических примесей.

К капролактаму, который используется в промышленности химических волокон для производства капроновых волокон и нитей, предъявляются очень высокие требования по степени очистки от посторонних примесей. Так, суммарное содержание микропримесей для капролактама первого сорта обычно не превышает $1 \cdot 10^{-3}\%$. В капролактаме высшего сорта содержание отдельных микропримесей не превышает $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4}\%$. Примеси карбонильных соединений в капролактаме особенно недопустимы. Эти соединения, имеющие в своем составе реакционноспособные карбонильную или альдегидную группы, могут оказывать влияние на ход процесса полимеризации.

Обнаружение следовых количеств карбонильных соединений возможно с помощью ВЭЖХ в сочетании с жидкостной экстракцией.

Для этого карбонильные соединения переводят в производные 2,4-динитрофенилгидразина (ДНФГ) по реакции:



Реакция с ДНФГ в кислой среде проходит количественно при комнатной температуре. При этом образуются соединения с высокими коэффициентами мольного погашения в УФ-области, что позволяет использовать высокочувствительный спектрофотометрический детектор в составе жидкостного хроматографа.

Перед хроматографическим разделением проводят концентрирование производных карбонильных соединений экстракцией в органическую фазу. В качестве органической фазы используют хлороформ с добавкой диметилтерефталата (ДМТ) в качестве внутреннего стандарта.

В ходе экстракции в органической фазе концентрируются производные карбонильных соединений с ДНФГ, а также ДМТ. Подавляющая часть не вступившего в реакцию ДНФГ, а также практически весь капролактам, остаются в водной фазе.

На рис. 1-3 приведены хроматограммы органической фазы после экстракции в случае:

- 1) анализа капролактама без добавки ДНФГ;
- 2) ввода ДНФГ без капролактама;
- 3) анализа капролактама в присутствии ДНФГ.

В первом случае на хроматограмме фиксируется только пик ДМТ (2); во втором случае, помимо ДМТ, появляются пики реагента (3, 5); в третьем – добавляются два пика карбонильных производных ДНФГ (3, 4), причем один из них: (3) – накладывается на пик реагента.

Таким образом, используя результаты «холостого опыта», можно оценить суммарное содержание карбонильных соединений в капролактаме.

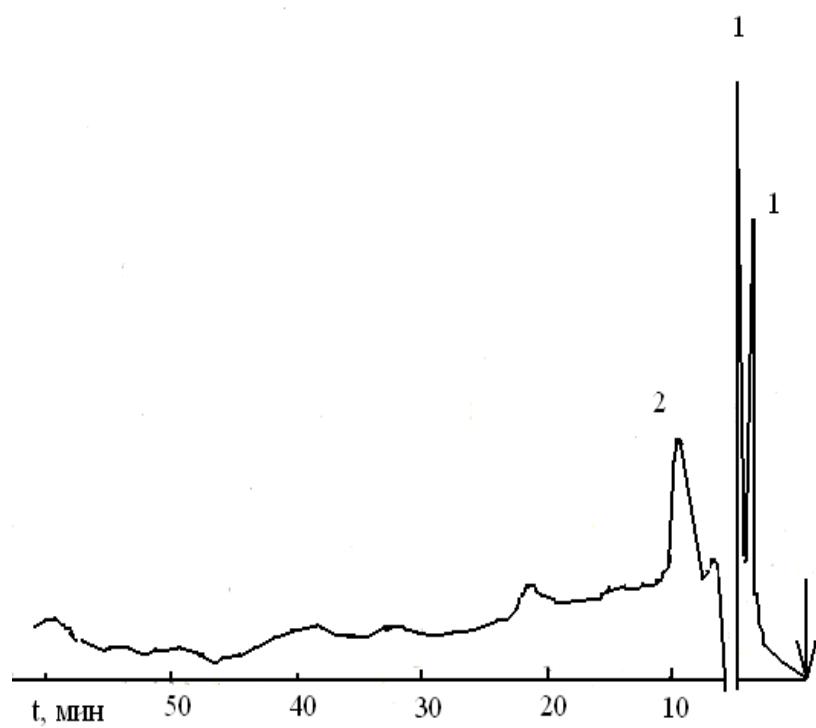


Рисунок 1 - Хроматограмма экстракта при анализе капролактама без добавления ДНФГ (2 – диметилтерефталат)

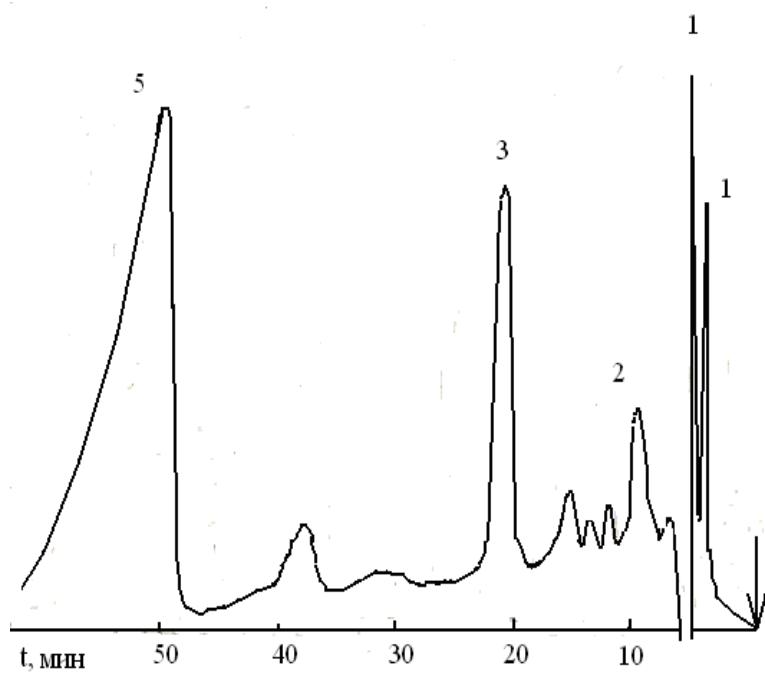


Рисунок 2 – Хроматограмма экстракта в отсутствии капролактама («холостой опыт»; 1 – хлороформ, 2 – ДМТ, 3 и 5 – ДНФГ)

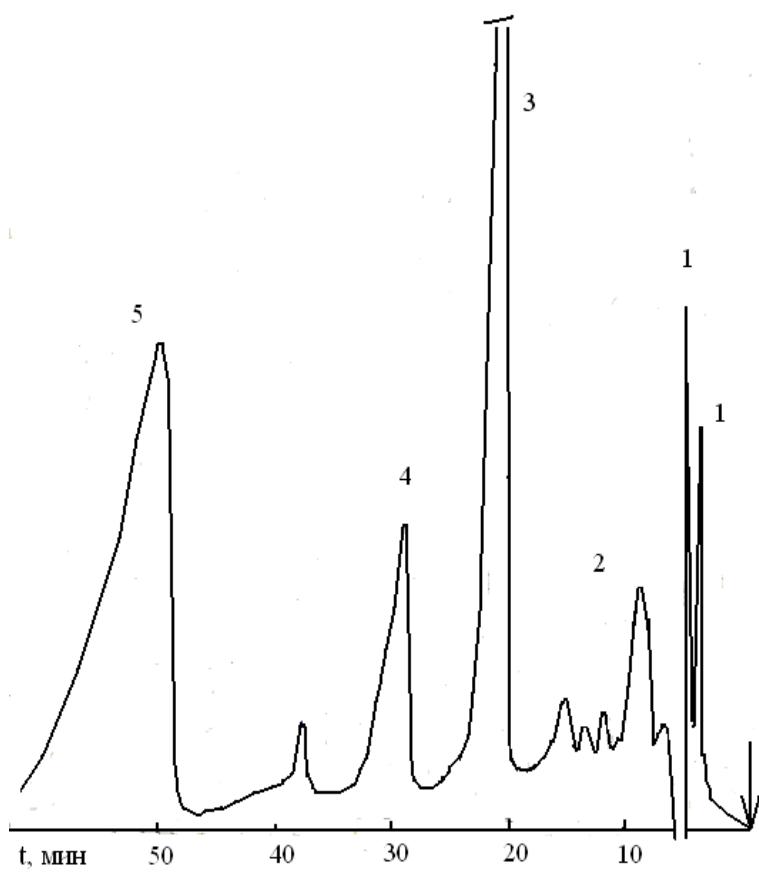


Рисунок 3 – Хроматограмма экстракта при анализе капролактама (1 – хлороформ, 2 – ДМТ, 3 – сумма ДНФГ и карбонильного производного ДНФГ, 4 – карбонильное производное ДНФГ, 5 – ДНФГ)

Методика выполнения анализа

Навеску 10 г капролактама растворяют в 10 мл воды в стакане вместимостью 50 см^3 . Смешивают 1 мл полученного раствора, 4 мл раствора соляной кислоты с концентрацией 2 моль/л и 0.5 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина с концентрацией 2 мг/мл в 2 моль/л соляной кислоты, помещая смесь в коническую колбу. Затем к смеси добавляют 1 мл раствора диметилтерефталата в хлороформе с концентрацией 0.01 мг/мл.

Колбу закрывают пробкой и встряхивают в течение 1 часа на аппарате для встряхивания. После расслаивания отбирают пробу объемом 4-6 мкл микрошприцем из слоя хлороформа.

Пробу вводят в дозатор хроматографа и хроматографируют при скорости потока элюента 1-1.5 мл/мин.

Аналогично проводят холостой опыт без раствора капролактама, заменяя его дистиллированной водой в количестве 1 мл.

В результате проделанной работы получают две хроматограммы: рабочую хроматограмму и хроматограмму «холостого опыта». На хроматограммах нумеруют разделённые пики, аналогично тому, как это сделано на рис. 2 и 3.

Для выделенных пиков определяют время удерживания (t , мин), высоту (H , мм), ширину на полувысоте ($B^{1/2}$, мм), а также площадь (S , мм^2) пика по уравнению $S = H^*B^{1/2}$.

Полученные данные заносят в табл. 4 отдельно для «холостой» и рабочей пробы:

Таблица 4

Результаты определения параметров хроматографических пиков при обнаружении карбонильных соединений в капролактаме

№ пика	t , мин	H , мм	$B^{1/2}$, мм	S , мм^2
1	-	-	-	-
2
3
4
5	...	-	-	-

Вычисление результата анализа

Суммарное содержание карбонильных соединений в капролактаме вычисляют по формуле:

$$X. \% = 0.1C[S_4 + (S_3 - S_3^x)]/S_2$$

Здесь C – концентрация ДМТ, $\text{мг}/\text{мл}$; S – площадь соответствующего по номеру пика; x – «холостая пробы».

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6

РАЗДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПРИРОДНЫХ ЛИПИДОВ

Липиды — жиры и жироподобные вещества растительного или животного происхождения — относятся к числу важных биологически активных веществ, входящих в состав всех живых клеток. Липиды различаются по химическому составу и строению. В состав природных жиров входят простые (триглицериды и другие сложные эфиры многоатомных спиртов, воски) и сложные или полярные липиды (фосфолипиды и др.), а также другие соединения, состоящие из структурных элементов простых и сложных липидов (моно- и диглицериды, свободные жирные кислоты и т. п.).

Для разделения простых и сложных липидов на ТСХ-пластинках используют подвижные фазы разной полярности. Идентификацию липидов в природных жирах проводят на основании литературных и экспериментальных данных, сравнивая значения R_f , полученные при использовании разных подвижных фаз.

В данной работе предлагается: 1) изучить влияние состава подвижной фазы на хроматографическую подвижность различных компонентов растительных жиров и найти оптимальный состав подвижной фазы для наилучшего разделения простых липидов; 2) оценить эффективность хроматографического концентрирования триглицеридов при использовании одной из изучаемых подвижных фаз; 3) провести идентификацию неизвестного природного жира.

Цель работы: Научиться разделять и идентифицировать природные липиды методом одномерной восходящей тонкослойной хроматографии.

Используемые реактивы и методики их приготовления

Природные жиры: подсолнечное, оливковое, соевое масла, рыбий жир.

1. Проявитель: пары йода.

2. Подвижные фазы (для разделения простых липидов): № 1 смеси гексана, диэтилового эфира и уксусной кислоты 85:14:1 (а) и 90:10:1 (б); №2 — смеси петролейного эфира, диэтилового эфира и уксусной кислоты 85:14:1 (а), 90:10:1 (б) и 70:30:2 (в).

3. ТСХ-пластинки.

4. Вещества, используемые в качестве «свидетелей».

5. Растворитель для исследуемых соединений: хлороформ.

Методика выполнения анализа

Наносят по одной капле каждого из анализируемых растворов природных липидов на стартовую линию пластинки и помещают ее в хроматографическую камеру с соответствующей подвижной фазой (№ 1 и 2). На расстоянии 1 см от пятен с анализируемым раствором наносят пятна 5 %-ных растворов "свидетелей", в качестве которых используют чистые вещества, предположительно содержащиеся в исследуемом жире (альдегиды, кислоты и т.д.). После развития и полного высушивания хроматограмм их помещают в камеру, насыщенную парами йода, и выдерживают до появления коричневых пятен (зоны липидов) на желтом фоне. Через 15—30 мин отмечают карандашом необходимые зоны и рассчитывают их R_f . Используя литературные данные, идентифицируют простые и сложные липиды в природном жире. Результаты оформляют в виде таблицы для каждой изученной хроматографической системы и всех объектов исследования.

Идентификация растительного или животного жира

На основании проведенных исследований по разделению и идентификации компонентов жиров с использованием разных хроматографических систем находят различия в хроматограммах, характерные для растительного или рыбьего жира. Исследуют раствор неизвестного природного жира, используя разные подвижные фазы (не менее двух), для которых наблюдавшиеся различия наиболее очевидны, и по наличию характерных зон (метод "свидетелей") устанавливают, какой жир (растительный или рыбий) был взят для исследования. На основании литературных данных идентифицируют наблюдаемые зоны липидов.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7

ОБНАРУЖЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ КОФЕИНА, ТИОФИЛИНА И ТИОБРОМИНА В РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТАХ

С помощью тонкослойной хроматографии возможно определение многих органических соединений в растительных субстратах. Для этого необходимо подобрать соответствующий каждому веществу экстрагент, а так же подвижную фазу, обеспечивающую оптимальные условия для выделения искомых компонентов.

Цель работы: научиться определять кофеин, тиофилин и тиобромин в экстрактах чая, кофе и какао методом одномерной восходящей тонкослойной хроматографии с использованием «свидетелей».

Используемые реагенты и методики их приготовления

1. Различные сорта чая, кофе и какао.
2. Проявитель: пары йода.
3. Подвижная фаза-толуол, ацетон, изопропиловый спирт, раствор аммиака (45:45:7:3).
4. ТСХ-пластинки.
5. Вещество, используемое в качестве «свидетеля» - кофеин, тиобромин и тиофилин.
6. Растворитель для исследуемых соединений: ацетон.

Методика выполнения анализа

Готовят экстракты растительных материалов в ацетоне путем выдерживания чайных листьев и зерен кофе в указанном растворителе в течение 10-15 мин.

Для определения и идентификации кофеина используют хроматографирование со «свидетелями». Наносят по одной капле каждого из анализируемых растворов, а также растворов «свидетелей» на стартовую линию пластинки и помещают ее в хроматографическую камеру с соответствующей подвижной фазой. После развития и полного высушивания хроматограмм их помещают в камеру, насыщенную парами йода и выдерживают до

появления коричневых пятен на желтом фоне. Через 15—30 мин отмечают карандашом необходимые зоны и рассчитывают их R_f .

Обнаружить пятна на хроматограмме можно также с помощью УФ камеры. Готовую хроматограмму помещают под УФ лампу и обводят четко различимые пятна простым карандашом.

По результатам проведенной работы сделать вывод о наличии кофеина, тиобромина и тиофилина в исследуемых образцах.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8

ОБНАРУЖЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ АНТИБИОТИКОВ И АЛКАЛОИДОВ В РАЗЛИЧНЫХ СУБСТРАТАХ ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННЫМ МЕТОДОМ

Метод тонкослойной хроматографии часто используют в органической химии для разделения, выделения, определения степени очистки и идентификации многих органических веществ, в том числе и лекарственных препаратов.

Цель работы: научиться использовать тонкослойную хроматографию для полуколичественного определения некоторых веществ в субстратах.

Используемые реактивы и методики их приготовления

1. Субстраты, содержащие определяемые вещества: лекарственные препараты различных антибиотиков (пенициллин, тетрациклин, эритромицин, линкомицин и др.); различные сорта табака.

2. Проявитель: пары йода.

3. Подвижные фазы:

- для элюирования эритромицина и линкомицина используют:
а) чистый метанол; б) хлороформ - метанол (95:5) в) хлороформ - метанол (1:1);

- для элюирования пенициллина: а) ацетон - метанол (1:1); б) изопропанол - метанол (3:7);

- для элюирования тетрациклина: а) н-бутанол - метанол – 10 % лимонная кислота (4:1:2); б) н-бутанол - метанол – 10 % лимонная кислота (4:2:2); в) н-бутанол - метанол – 10 % лимонная кислота (4:3:2);

- для элюирования никотина: а) метанол; б) метанол – н-бутанол – бензол – вода (12:3:2:3); в) метанол – ацетон – триэтаноламин (1:1:0.03).

4. ТСХ-пластинки.

5. Вещества, используемое в качестве «свидетелей».

6. Растворители для исследуемых соединений: хлороформ, ацетон.

Методика выполнения анализа

Для экстракции антибиотиков или алкалоидов из исследуемых субстратов, в качестве экстрагентов используют хлороформ или ацетон. Предварительно взвешенные аналитические пробы препаратов антибиотиков помещают в колбы, содержащие 10 мл экстрагента, и экстрагируют на аппарате для встряхивания в течение 10-20 мин. Для растительных субстанций время экстракции увеличивают до 30-60 мин.

При выполнении полуколичественного метода для каждого вещества нужно приготовить «стандартную» пластину. Для этого необходимо приготовить серию стандартных растворов с известной концентрацией вещества ~ «свидетеля». Концентрацию варьируют от 0.1 до 0.001 мг/л. Затем на стартовую линию хроматографической пластиинки микрошипцием наносят одинаковые количества стандартных растворов (3-5 мкл). Пятна наносятся на одинаковом расстоянии друг от друга, приблизительно в 1 см. Рядом со стандартными пятнами, наносят такое же количество исследуемого раствора. Пластины подсушивают над электрической плиткой и помещают в хроматографическую камеру с соответствующим элюентом. После развития и полного высушивания хроматограмм их помещают в камеру, насыщенную парами йода и выдерживают до появления коричневых пятен на желтом фоне. Через 15—30 мин отмечают карандашом необходимые зоны, рассчитывают их R_f и сравнивают по интенсивности со стандартными пятнами различной концентрации. На основании визуальных наблюдений делают вывод о качественном и приблизительном количественном составе исследуемых образцов.

По полученным результатам рассчитывают содержание искомых веществ в аналитических пробах и делают вывод о качестве исследуемых образцов.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 9

ОБНАРУЖЕНИЕ БЕНЗОЛА, НАФТАЛИНА И АНТРАЦЕНА В ИХ СМЕСИ МЕТОДОМ ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ВЭЖХ

При проведении обращено-фазового варианта ВЭЖХ (ОФ ВЭЖХ) элюент необходимо подбирать таким образом, чтобы увеличивалась селективность и улучшалось разделение соединений. В ОФ ВЭЖХ элюирующая сила элюента регулируется содержанием модификаторов: ацетонитрила, метанола или 2-пропанола в элюенте типа «вода - модификатор». Чем больше модификатора в элюенте, тем больше элюирующая сила элюента, тем меньше удерживаемый объем вещества.

Цель работы: Научиться определять бензол, нафталин и антрацен, в их смеси методом обращено-фазовой жидкостной хроматографии. Научиться подбирать элюент путем регулирования его элюирующей силы для увеличения селективности и улучшения разрешений определяемых соединений.

Используемые реактивы и методики их приготовления

1. Анализируемая смесь: растворы бензола, нафталина и антрацена в подвижной фазе.
2. Элюент - ацетонитрил: вода (55:45).
3. Неподвижная фаза: Сепарон C₁₈.

Методика выполнения анализа

Работа проводится на жидкостном хроматографе марки «Милихром - 5» со стальной колонкой 5x80 мм. Включают хроматограф в сеть и прогревают его в течение 30 мин, в это же время пропускают подвижную фазу через колонку для ее кондиционирования.

В хроматограф поочередно вводят растворы сравнения бензола, нафталина и антрацена и определяют их времена удерживания t_R и исправленные времена удерживания t'_R .

Далее хроматографируют образец анализируемой смеси и идентифицируют полученные пики по времени удерживания. По хроматограмме анализируемой смеси рассчитывают число теоретических тарелок (N) для разделяемых веществ, их коэффициенты селективности α и разрешение для соседних пиков R_s по формулам (1-3).

$$N = 16(t_R/\mu), \quad (1)$$

где t_R - время удерживания компонента, мин; μ - ширина пика, мин;

$$\alpha = t'_{R2}/t'_{R1} \quad (2)$$

где t'_{R1} - исправленное время удерживания первого компонента, мин; t'_{R2} - исправленное время удерживания второго компонента, мин.

$$R_s = (t'_{R2} - t'_{R1})^2/(\mu_1 + \mu_2) \quad (3)$$

Содержание компонентов в анализируемой смеси определяют методом внутренней нормализации. В этом методе предполагается, что пики всех возможных компонентов смеси зафиксированы на хроматограмме, а сумма их площадей (S) равна 100 %. Расчет ведут по формуле (4):

$$X (\%) = 100S_i/(S_1 + S_2 + S_3 + \dots + S_n),$$

где n - число компонентов смеси; S - площадь хроматографического пика.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 10

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ВЭЖХ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФАЛЬСИФИКАЦИИ КОФЕ

Фальсификацию кофе обычно определяют по количеству кофеина, однако в настоящее время широко распространена практика добавления в кофе или кофейный суррогат фармацевтического кофеина. Поэтому определять подлинность кофе только по

содержанию в нем кофеина невозможно. Для определения подлинности кофе необходимо добиться разделения и идентификации кофейных кислот. Это становится возможным при использовании универсального сорбента и эффективных колонок.

Цель работы: научиться использовать универсальный элюент в методе обращенно-фазовой жидкостной хроматографии для достижения наилучшего разделения кофейных кислот в различных образцах кофе.

Используемые реагенты и методики их приготовления.

1. Анализируемые образцы: растворимый кофе различных марок.
2. Элюент: ацетонитрил – смесь 0.03 М KH_2PO_4 и 0.02 М диэтиламин (ДЭА), подкисленная фосфорной кислотой до $\text{pH} = 2.6$ в соотношении 18:82.

Универсальный элюент указанного состава готовится следующим образом: в 100 мл заранее приготовленного 0.03 М водного раствора KH_2PO_4 добавляют 1 мл ДЭА. Приготовленный раствор доводят фосфорной кислотой до $\text{pH} = 3$. Полученный буфер смешивают с ацетонитрилом в необходимом соотношении. 3.

Неподвижная фаза: Сепарон C_{18} .

Методика выполнения анализа

Работа проводится на жидкостном хроматографе марки «Милихром-5» со стальной колонкой 5x80 мм. Включают хроматограф в сеть и прогревают его в течение 30 мин, в это же время пропускают подвижную фазу через колонку для ее кондиционирования.

В хроматограф вводят раствор сравнения кофеина и элюируют универсальным элюентом со скоростью 100 мкл/мин. Определяют его время удерживания t_R и исправленное время удерживания t'_R . Далее в тех же условиях хроматографируют образец анализируемой смеси и идентифицируют полученные пики по времени удерживания.

Анализ хроматограмм образцов различных видов кофе позволяет сделать вывод о возможной фальсификации кофе.

Наличие на хроматограмме пиков, соответствующих кофейным кислотам, свидетельствует о подлинности исследуемого кофе. На хроматограмме суррогатного кофе с синтетическим кофеином четко прослеживается пик кофеина и пик, характеризующий основной субстрат. Пики кофейных кислот отсутствуют.

По хроматограммам образцов кофе рассчитывают число теоретических тарелок N , коэффициенты селективности α и разрешение для соседних пиков R_s по формулам (1-3) к лабораторной работе № 8.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 11

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГРАДИЕНТНОГО ЭЛЮИРОВАНИЯ ПРИ АНАЛИЗЕ НЕФТЕПРОДУКТОВ

Изократическим элюированием называется использование элюента постоянного состава в течение всего анализа. Достоинством такого элюирования¹ является техническая простота исполнения и высокая воспроизводимость времен удерживания, площадей и пиков. Для хроматографирования на силикагельных колонках (нормально-фазовая хроматография), такой вид элюирования является единственным возможным из-за сложности регенерации колонки.

Более эффективным способом повышения качества разделения смесей является градиентное элюирование. Смысл приема заключается в увеличении по определенному закону элюирующей силы элюента в процессе одного анализа.

Для проведения градиентного элюирования используются колонки, заполненные обращено-фазовым сорбентом. В этом случае увеличение элюирующей силы происходит за счет увеличения концентрации модификатора (ацетонитрила, метанола и т.д.) в элюенте в процессе одного анализа. Градиентное элюирование используют в том случае, когда при использовании изократического элюирования невозможно добиться разделения всех компонентов, сильно различающихся по времени удерживания.

Цель работы: научиться применять градиентное элюирование в методе обращено-фазовой ВЭЖХ для улучшения разделения компонентов анализируемых смесей.

Используемые реагенты и методики их приготовления

1. Анализируемые образцы: бензин различных марок (100 мкл бензина, растворенного в 25 мл ацетонитрила).
2. Элюент: ацетонитрил – вода в соотношениях 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30.
3. Растворы сравнения: растворы бензола, толуола, о-ксилола, м-ксилола, п-ксилола в ацетонитриле (100 мкл, растворенного в 25 мл ацетонитрила).
4. Неподвижная фаза: Сепарон С₁₈.

Методика выполнения анализа

Работа проводится на жидкостном хроматографе марки «Милихром-5» со стальной колонкой 5x80 мм. Включают хроматограф в сеть и прогревают его в течение 30 мин, в это же время пропускают подвижную фазу ацетонитрил - вода в соотношении 60:40 через колонку для ее кондиционирования.

Вначале получают хроматограмму анализируемого вещества, используя изократическое элюирование, т.е. элюирование подвижной фазой постоянного состава. В хроматограф вводят раствор сравнения бензола и элюируют смесью ацетонитрил - вода в соотношении 60:40 со скоростью 150 мкл/мин. Определяют его время удерживания t_R и исправленное время удерживания t'_R . Далее в тех же условиях хроматографируют другие растворы сравнения и определяют для них время удерживания и исправленное время удерживания. После этого хроматографируют образец бензина и идентифицируют полученные пики по времени удерживания. Отмечают очередность выхода веществ, форму пиков, эффективность разделения.

Второй раз хроматограмму анализируемого вещества получают, используя градиентное элюирование, т.е. элюирование подвижной фазой переменного состава. Предварительно через колонку пропускают подвижную фазу состава ацетонитрил - вода в

соотношениях 30:70. Насос заполняют элюентом в следующей последовательности: вначале набирают смесь ацетонитрил – вода соотношения 70:30 (т.е. раствор, обладающий максимальной элюирующей силой), затем используют соотношения 60:40 и т.д. в порядке уменьшения элюирующей силы. В хроматографическую колонку вводят 4 мкл раствора пробы бензина и элюируют в тех же условиях, что и в первом варианте. При этом в процессе элюирования состав подвижной фазы будет изменяться с постепенным возрастанием элюирующей силы. После получения хроматограммы идентифицируют полученные пики по очередности выхода, оценивают форму ширину и площадь каждого пика, проводят необходимые расчеты и сравнивают их с результатами предыдущего анализа.

По окончании работы делают вывод о целесообразности применения градиентного элюирования при анализе сложных органических смесей.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Сущность хроматографических методов анализа.
2. Классификация хроматографических методов анализа.
3. Жидкостная хроматография, Определение, возможности метода.
4. Типы жидкостной хроматографии. Колоночный и плоскостной варианты.
5. Принципиальная схема жидкостного хроматографа.
6. Детекторы. Требования, предъявляемые к детекторам.
7. Сорбенты, используемые в жидкостной хроматографии.
8. Нормально-фазовый вариант жидкостной хроматографии. Особенности и возможности метода.
9. Нормально-фазовый вариант жидкостной хроматографии. Сорбенты и элюенты.
10. Обращенно-фазовый вариант жидкостной хроматографии. Особенности и возможности метода.
11. Обращенно-фазовый вариант жидкостной хроматографии. Сорбенты и элюенты.
12. Способы регулирования элюирующей силы подвижной

фазы в ОФ ВЭЖХ. Какие вещества называют модификаторами.

13. Что такое изократическое элюирование? В каких случаях его используют.

14. Что такое градиентное элюирование? В каких случаях его используют. Его достоинства и недостатки.

15. Какой элюент называют универсальным. В каких случаях его используют.

16. Особенности работы жидкостного хроматографа «Милихром - 5».

17. Регенерация колонки с обращенно - фазовым сорбентом.

18. Бумажная хроматография. Достоинства и недостатки метода. Границы применимости.

19. Требования, предъявляемые к хроматографической бумаге.

20. Типы бумажной хроматографии: линейная (одномерная и двухмерная, восходящая и нисходящая), радиальная.

21. Способы получения радиальной хроматограммы.

22. Способы получения линейной хроматограммы. Требования к аппаратурному оформлению бумажной хроматографии.

24. Тонкослойная хроматография. Достоинства и недостатки.

25. Сорбенты для ТСХ.

26. Что такое R_f ? R_f для линейной и радиальной хроматограммы.

27. Хроматографирование со «свидетелем». Сущность, методика выполнения.

28. Основные принципы подбора элюентов для ТСХ.

29. Типы тонкослойной хроматографии. В каких случаях применяют двухмерную хроматографию.

30. Полуколичественный метод ТСХ. Примеры применения.

31. Хроматографические параметры. Время и объем удерживания.

32. Хроматографические параметры. Коэффициент распределения, коэффициент ёмкости колонки.

33. Теория теоретических тарелок.

34. Критерии эффективности Хроматографического

процесса. Высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ).

35. Что такое коэффициент селективности? Что он характеризует и от чего зависит?

37. Что такое разрешение R_s ?

38. Как зависит разделение смеси двух веществ от эффективности колонки и селективности сорбента?

39. Качественный анализ методом жидкостной хроматографии.

40. Применение метода градуировочного графика для количественного анализа методом жидкостной хроматографии.

41. Применение метода нормировки для количественного анализа методом жидкостной хроматографии.

42. Применение метода внутреннего стандарта для количественного анализа методом жидкостной хроматографии.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Фадеева В.И., Шеховцова Т.Н., Иванов В.М. и др. Основы аналитической химии. Практическое руководство [Текст]: учеб. пособие для вузов; под ред. Ю.А. Золотова. - М.: Высш. шк., 2001. - 463 с.

2. Золотов Ю.А., Дорохова Е.Н., Фадеева В.И. и др. Основы аналитической химии, в 2 кн. Кн.1 Общие вопросы. Методы разделения [Текст]: учеб. для вузов; под ред. Ю.А. Золотова. - М.: Высш. шк., 2002.-351 с.

3. Золотов Ю.А., Дорохова Е.Н., Фадеева В.И. и др. Основы аналитической химии, в 2 кн. Кн.2. Общие вопросы. Методы разделения [Текст]: учеб. для вузов; под ред. Ю.А. Золотова. - М.: Высш. шк., 2002 -351 с.

4. Жуков А.Ф., Колосова И.Ф., Кузнецов В.В. и др. Аналитическая химия. Химические методы анализа [Текст]: учеб, для вузов.; Под ред. О.М. Петрухина. - М.: Химия, 1992. - 400 с.

5. С. Пери, Р. Амос, П. Брюэр. Практическое руководство по жидкостной хроматографии [Текст]: Под ред. К.В. Чмутова. – М.: Мир, 1974. - 260 с.

6. Шатт В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография [Текст]: Основы теории. Методология. Применение

в лекарственной химии - Рига.: Зинатне, 1988. - 390 с.

7. А. Златкис. Р. Кайзер. Высокоэффективная тонкослойная хроматография [Текст]: Под ред. В.Г. Березкина. - М.: Мир, 1979. - 245 с.