

КІЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ
ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

Катедра аналітичної хімії

НАВЧАЛЬНИЙ ПОСІБНИК

Лисенко О.М., Левчик В.М., Ракс В.А., Ковальчук Т.В.

**ЛАБОРАТОРНИЙ ПРАКТИКУМ
З ОСНОВ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ
КОЛОНКОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ**

до виконання лабораторних робіт
для студентів ОС «бакалавр» хімічного факультету

КИЇВ 2023

Рецензенти:

Олександр Ройк, професор катедри фізичної хімії,

Ольга Гордієнко, доцент катедри органічної хімії,
хімічний факультет;

Світлана Грінь, доцент катедри супрамолекулярної хімії
Науково-навчального інституту високих технологій,
Київський національний університет імені Тараса Шевченка.

Ухвалено науково-методичною радою Київського національного

університету імені Тараса Шевченка 7 грудня 2023 року

(протокол №11-23)

Лисенко О.М., Левчик В.М., Ракс В.А., Ковальчук Т.В.

Лабораторний практикум з основ високоефективної колонкової хроматографії.

Навчальний посібник до виконання лабораторних робіт для студентів ОС «бакалавр» хімічного факультету. 2023. 35 с.

Навчальний посібник містить лабораторні роботи з методів капілярної газової та високоефективної рідинної хроматографії, в ході виконання яких студенти ознайомлюються з будовою газового і рідинного хроматографів, навчаються основам роботи з програмним забезпеченням на прикладі хроматографів фірми Agilent. На газовому хроматографі виконують якісне визначення компонентів суміші, обчислюють характеристики ефективності капілярної колонки, досліджують вплив швидкості потоку газу-носія на ефективність колонки, вплив кількості речовини на форму хроматографічного піку. У неактивному режимі програмного забезпечення рідинного хроматографа обробляють хроматограми, проводять якісне визначення сполук та обчислюють характеристики ефективності капілярної колонки для рідинної хроматографії.

Посібник призначено для студентів хімічних та біохімічних спеціальностей вищих навчальних закладів.

ЗМІСТ

ВСТУП	4
Словник термінів	5
Лабораторні роботи	6
<i>Лабораторна робота №1. Якісне визначення речовин методом газової хроматографії. Обчислення параметрів ефективності колонки</i>	6
Експериментальна частина	6
Порядок виконання	8
Контрольні запитання	16
<i>Лабораторна робота №2. Оптимізація хроматографічного розділення шляхом зміни швидкості потоку газу-носія</i>	17
Експериментальна частина	18
Порядок виконання	19
Контрольні запитання	22
<i>Лабораторна робота №3. Вплив кількості речовини на симетрію хроматографічних піків та роздільну здатність системи у газовій хроматографії</i>	23
Експериментальна частина	24
Порядок виконання	24
Контрольні запитання	26
<i>Лабораторна робота №4. Газохроматографічний кількісний аналіз розчину з відомими компонентами. Обчислення методом зовнішнього стандарту</i>	27
Експериментальна частина	28
Порядок виконання	29
Контрольні запитання	31
<i>Лабораторна робота №5. Якісне визначення речовин методом високоефективної рідинної хроматографії. Оцінка ефективності колонки</i>	32
Експериментальна частина	33
Порядок виконання	33
Контрольні запитання	35
Список літератури	36

ВСТУП

На катедрі аналітичної хімії протягом 50ти років викладають студентам ОС «бакалавр» хроматографічні навчальні дисципліни, до складу яких входять лабораторні роботи з класичної (малоекспективної) хроматографії. Протягом останніх 2х десятиріч викладачі оновили ці дисципліни і доповнили лабораторними роботами з газової та високоефективної рідинної хроматографії.

Метою освітніх компонент з хроматографії є навчання студентів теорії хроматографії, застосуванню хроматографічних методів в аналізі, практичному виконанню якісного та кількісного визначення речовин методом класичної рідинної хроматографії, ознайомленню студентів з основами роботи на газовому та рідинному хроматографах та користуванню програмним застосунком – «Хімічна станція», а також умінню коректно обробляти та оформляти отримані результати аналізу.

У ході виконання робіт з газової хроматографії студенти отримують навички створення активного *методу* у хімстанції, навички керування хроматографічною системою під час розділення і якісного визначення компонентів, інтегрування отриманих хроматограм, визначення ефективності хроматографічної колонки, вибору оптимальної швидкості потоку газу-носія, впливу кількості введені речовини на форму хроматографічного піку. Робота з високоефективної рідинної хроматографії присвячена якісному визначенням сполук, обчисленню характеристик ефективності колонки.

Проведення лабораторних робіт передбачає одночасне користування хімстанцією в активному (on-line) та не активному (off-line) режимах.

СЛОВНИК ТЕРМІНІВ

Метод – набір параметрів для проведення аналізу однієї проби на газовому хроматографі. Метод містить таблиці з параметрами: температура випарника, термостата, тиск у системі тощо. Метод створюють шляхом збереження даних у цих таблицях.

Метод ESTD – метод зовнішнього стандарту.

Сигнал – так у програмному застосунку до приладу «Хімічна станція» називають хроматограму.

Септа - прокладка з термічно стійкої силіконової гуми.

Хімічна станція (хімстанція) – система програмного забезпечення для керування приладом й аналізу результатів.

Розгонка – хроматографування (розділення) суміші з одночасним записом хроматограми.

On-line – активний (керувальний) режим роботи хімстанції, що застосовують безпосередньо для керування роботою хроматографу.

Off-line – не активний (не керувальний) режим роботи хімстанції, в якому відсутній зв'язок з хроматографом. Цей режим застосовують для аналізу результатів без увімкнення приладу.

В описані лабораторних робіт наведена чітка послідовність дій, які має виконати оператор (студент-виконавець).

Складові звіту, який студенти оформляють за результатами лабораторної роботи.

Назва. Мета. Завдання.

Розділ 1. Експериментальна частина. У цьому розділі записуємо: прилад, посуд, реагенти; параметри *методу*; формули для обчислень.

Розділ 2. Результати та їхнє обговорення. У цьому розділі наводимо пронумеровані таблиці та рисунки з результатами вимірювань й обчислень, а також критичне обговорення результатів.

Висновки.

Список літератури.

Лабораторна робота №1.

Якісне визначення речовин методом газової хроматографії. Обчислення параметрів ефективності колонки

Мета. Ознайомитися з принципом роботи хроматографу Agilent 6890 з капілярним випарником. Провести якісний аналіз суміші циклогексану, толуену й *n*-октану. Обчислити параметри ефективності колонки.

Завдання, які слід виконати у ході лабораторної роботи

1. Ознайомитися з процедурою ввімкнення хроматографу.
2. Створити *метод* аналізу у хімстанції (on-line).
3. Виконати розгонку суміші та інтегрування отриманої хроматограми у створеному *методі* в хімстанції (off-line).
4. Виконати розгонку парів індивідуальних речовин та інтегрування отриманих хроматограм (off-line).
5. Провести ідентифікацію досліджуваних компонентів.

Експериментальна частина

Прилади, посуд, реактиви

1. Газовий хроматограф Agilent Technologies з капілярним інжектором, з полуменево-іонізаційним детектором.
2. Капілярна колонка HP-5 (30 м × 320 мкм × 0,25 мкм, 5 % Phenyl-methyl-siloxane).
3. Балони з газами: гелій ТУ 51-40-80, водень технічний А ГОСТ 3022-80, повітря стиснене ГОСТ 17433-80 клас 0.
4. Мікрошприц.
5. Метанол «для ВЕРХ».
6. Суміш циклогексану, толуену й *n*-октану у метанолі. Концентрації розчинів уточнює інженер лабораторії.

Теоретичні відомості

Ефективність колонки кількісно характеризують числом теоретичних тарілок і висотою, еквівалентною теоретичній тарілці, (BETT). Число теоретичних тарілок (N) обчислюють за часами утримування за формулами:

$$N = 5,55 \cdot \left(\frac{t_R}{w_{0,5}} \right)^2 \quad (1) \quad N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 \quad (2)$$

де w і $w_{0,5}$ - ширина пiku при його основі й ширина пiku на половині його висоти, відповідно, виміряні у хв.

Число ефективних теоретичних тарілок ($N_{\text{еф}}$) обчислюють за виправленими часами утримування за формулами:

$$N_{\text{еф}} = 5,55 \cdot \left(\frac{t'_R}{w_{0,5}} \right)^2 \quad (3) \quad N_{\text{еф}} = 16 \cdot \left(\frac{t'_R}{w} \right)^2 \quad (4)$$

Висоту, еквівалентну теоретичній тарілці, (H) і висоту, еквівалентну ефективній теоретичній тарілці, ($H_{\text{еф}}$), обчислюють за формулами:

$$H = \frac{L}{N}, \quad (5) \quad H_{\text{еф}} = \frac{L}{N_{\text{еф}}} \quad (6)$$

де L – довжина колонки, см.

Показники $N_{\text{еф}}$ і $H_{\text{еф}}$ зазвичай застосовують для оцінки ефективності капілярних колонок.

Реальне число теоретичних тарілок можна обчислити так:

$$N_{\text{real}} = 5,55 \cdot \left(\frac{t'_R}{w_{0,5} - w_{0,5}^0} \right)^2 \quad (7)$$

де $w_{0,5}^0$ - ширина пiku не утримуваного компоненту.

Число теоретичних тарілок на метр (N_m [1/м]):

$$N_m = 100 \cdot \frac{N}{L} \quad (8).$$

Критерій розділення обчислюють за формулою:

$$R_s = \frac{\Delta t_R}{w_{0,5(1)} + w_{0,5(2)}} \quad (9),$$

де Δt_R – часовий проміжок між верхівками двох сусідніх хроматографічних піків, хв; $w_{0,5(1)}$ і $w_{0,5(2)}$ – ширини двох сусідніх хроматографічних піків на половині їхньої висоти, хв.

Порядок виконання

1. Уведення газового хроматографа у сталий режим дії.

1. Відкручують вентиль на балоні з He і редуктором виводять вихідний тиск на 5 атмосфер (0,5 мPa).

2. Відкручують вентиль на балоні з повітрям, редуктором виводять вихідний тиск на 5 атмосфер (0,5 мPa). У разі використання генератора стисненого повітря, вмикають у мережу генератор і піднімають кнопку увімкнення.

3. Вмикають хроматограф, натиснувши білу кнопку на його передній панелі.

4. Відкручують вентиль на балоні з H₂, редуктором виводять вихідний тиск на 2 - 3 атмосфери.

5. Вмикають комп'ютер та завантажують хімстанцію. Першою завантажують хімстанцію у керувальному режимі (**on-line**), потім завантажують хімстанцію в режимі **off-line**. У результаті хроматограф буде виведено у сталий режим дії.

2. Створення методу для хроматографування.

Процедура 1. Створення інструментального методу збору даних шляхом редагування стандартного методу.

1. У режимі **on-line** завантажують стандартний метод, а саме у пункті меню *Метод / завантажити...* обирають метод **def1_gc.m**.

2. Одразу зберігають відкритий метод під новою назвою – обирають пункт меню *Метод / Зберегти метод як... /* указують назву **L1_initials.m**.

3. Обирають пункт меню *Метод / Редактувати метод повністю...*, відмічають усі чотири запропоновані розділи редагування.

4. Послідовно редагують параметри хроматографування методу, замінюючи їх наведеними нижче.

ТЕРМОСТАТ	
Режим:	градієнтний
Температура програма	40°C (2 хв), 40-55°C (10°C/хв)
КОЛОНКА	
Режим потоку:	сталий потік у колонці
Швидкість потоку:	2,5 мл/хв
Тиск:	10,92 psi <i>хімстанція автоматично обчислює тиск.</i>
Середня (лінійна швидкість)	39 см/с <i>Хімстанція автоматично обчислює лінійну швидкість.</i>
ВИПАРНИК	
Температура:	250°C
Режим роботи:	3 розділенням потоку (Split)1:50
Час увімкнення продувки:	2 хв
<i>Час продувки випарника газом-носієм та введення проби в колонку, до моменту переходу в режим Split.</i>	
Швидкість потоку продувки:	20 мл/хв
<i>Відповідно до швидкості потоку газу-носія на виході з випарника в режимі розділення потоку.</i>	
Режим економії газу:	увімкнути
Сумарний потік	129,8 мл/хв
Тиск:	<i>хімстанція задає автоматично.</i>
ДЕТЕКТОР	
Температура	300°C
Швидкість потоку повітря	350 мл/хв
Швидкість потоку H ₂	30 мл/хв
Допоміжний газ («make-up»):	He, 25 мл/хв
Фоновий сигнал	має бути <20 pA
Зміщення полум'я:	2 pA <i>(мінімальний рівень сигналу), - означає, що полум'я у детекторі згасло, - це є командою для його повторного підпалення.</i>

СИГНАЛИ

Сигнал 1	Передній детектор (полуменево-іонізаційний)
Частота вибірки	20 Hz (оптимальна для ПІД)
Мінімальна ширина піку	0,01 хв
Зберігати	все

Під час редагування Методу звертають особливу увагу на величину її допустимі межі кожного параметру.

Після введених змін періодично натискайте опцію «Застосувати». Опцію «Ok» натисніть після внесення всіх змін.

5. Закінчивши редагування *методу* ще раз зберігають його під вже заданою назвою: обирають пункт меню «Метод / зберегти метод як... / L1_initials.m» .

Таблиця редагування параметрів методу містить 4 розділи.

Пояснення значення кожного розділу редагування

1. Розділ «відомості про метод»	Інформаційне поле, в яке вводять коротку текстову інформацію про метод. Цей розділ застосовують для нагадування; не застосовують для управління, обчислень.
2. Розділ «Прилад/ збір даних»	Розділ, в якому задають параметри збору даних - умови хроматографування.

Порядок задання параметрів у розділі «Прилад/ збір даних»

- A). Піч (термостат). Програмування температурного режиму термостату (ізотермічний чи градієнт температури) та самої температури, чи температурної програмами, відповідно.
- B). Колонки. Програмування режиму потоку газу-носія в колонці. Обирають один з чотирьох режимів: постійний потік, постійний тиск, програмований потік, програмований тиск. Відповідно до заданого режиму, обирають величину потоку/тиску/лінійної швидкості (постійну чи змінну), а решту параметрів хімстанція обчислює автоматично.
- C). Порти (інжектори). Задають режим роботи, температуру, газові потоки, об'єм та час продувки випарника, економію газу. Можливими є чотири режими: розділення потоку (Split), без розділення потоку (Splitless), імпульсний з/без розділення потоку.
- D). Детектор. Температура детектора і швидкість потоку газів у детекторі.
- E). Сигнали. Параметри реєстрованих сигналів.
- F). Опції. Одиниці вимірювання тиску та ін.
- G). Крані. Управління роботою багатоходових кранів.

-
3. Розділ «Аналіз

даних».	Розділ є набором вікон:
a) параметри, що використовують для обробки сигналу у вікні «Умови інтегрування»,	
b) у вікні «Специфікація звіту» вказують тип та спосіб звіту за результатами проведеного хроматографування; до початку роботи інфо в цих вікнах не змінюють; на всі запропоновані опції натискають «OK»;	
c) параметри аналізу даних редагують, підбираючи їх у процесі обробки отриманих хроматограм; тільки тоді інфо у цих вікнах змінюють та зберігають (вони є частиною методу).	
4. Розділ «формуляр ходу аналізу».	Відмічають потрібну для виконання частину методу (збір даних, аналіз даних).

Оскільки аналіз даних наразі не виконують (ще невідомо, як саме це необхідно робити), то звіт за результатами ще не потрібен, тому відмічають тільки частину методу «Збір даних».

3. Ознайомлення з прийомами введення (інжекцією) проби мікрошприцем.

Перед аналізом мікрошприц 10-20 разів промивають досліджуваною рідкою сумішшю, відбирають необхідний об'єм суміші, а потім швидко вводять голку шприца, проколюючи септу, у випарник на максимально можливу глибину. Швидко натискають поршень, виймають голку з інжектора і натискають кнопку **Старт** на панелі пристрію.

При дозуванні треба притримувати поршень пальцем, а зусилля спрямовувати уздовж всієї мікрошприця.

Промивайте мікрошприц відповідними розчинниками одразу після інжекції. Через погану змочуваність скляного катіляру углеводнями необхідно 3-5 разів промити мікрошприц пробою, яку аналізують до введення її у випарник.

4. Хроматографування розчину проби.

Процедура 3. Виконання методу.

1. Після того, як всі інструментальні параметри досягли заданих величин, тобто прилад готовий до введення проби, у керувальному режимі хімстанції в методі **L1_initials.m** у вікні стану засвічується зелений індикатор «*Ready*».

2. Вибирають пункт меню «*Вимірювання / Відомості про зразок*» та заповнюють інформацію в активному вікні (дивись процедуру 4 нижче). Файл даних називають **Samp_.D**.

3. В активному вікні натискають поле «*Пуск методу*».

4. Для перегляду готовності приладу до аналізу на панелі хроматографа натискають клавішу **Препран**, потім клавішу **Статус**. При цьому засвічується жовтий індикатор чинної функції **Препран** та **Not ready** - червона індикація на табло стану приладу.

5. Промивають аналізованим розчином шприц 5-10 разів. Відбирають 1 мкл проби, видаляють пухирі повітря з аліквоти.

6. Поява на табло приладу інформації **Статус: Ready for injection**, яка у вікні «*Стан Приладу*» хімстанції узгоджено із зеленим індикатором «*Ready*», сигналізує про готовність приладу до розгонки. Уводять пробу з наступним миттєвим натисканням клавіші **Старт**.

7. У ході аналізу слідкують за інформацією про статус аналізу та появою хроматограми (Сигнал 1) на екрані комп'ютеру.

8. Переходять у режим хімстанції off-line. Завантажують отриману хроматограму в методі **L1_initials.m**, підбирають умови інтегрування та зберігають метод під новою назвою **L1i_initials.m**.

Процедура 4. Заповнення відомостей про зразок (Табл. 1.2):

1. Задають «*Ім'я оператора*».

2. Вибирають пункт меню «*префікс/лічильник*». У полі «*сигнал 1*» задають фіксований префікс-лічильник, який відповідає назві зразку (вибирають букви, латинську абетку, чи цифри, до 8 символів). Лічильник виставляють на 1. Наприклад, задавши назву файлу **Samp_**, Ви отримаєте повну назву **Samp_0001** (символи, яких не вистачає до 8 символів будуть

замінені нулем). Цю назву міститиме назва файлу, а саме: Samp_0001.d. При наступному аналізі в назві файлу номер «лічильника» автоматично збільшується на 1. Але завжди залишається опція змінити номер самостійно.

3. Вводять назву у полі «*Назва підкatalogу*» (до 8 символів, рекомендуємо ввести дату у форматі PPPRMMЧЧ).

4. Додаткову текстову інформацію задають у вікнах «*Ім'я зразку*» та «*Коментарій*». Ця інформація зберігається разом з файлом хроматограми. Вона виводиться на екран при запитуванні інформації щодо файлу, а також відображатиметься у звіті про аналіз.

5. Решту вікон, а саме: «*кількість зразку, кількість стандарту, множник*» та «*розбавлення*», не заповнюють.

5. Опанування функціоналом графічного інтерфейсу хімстанції.

Увага: У першу чергу слід навчитися працювати в режимі *on-line*, (див. розділ 4). Після того як буде готова перша хроматограма, слід перейти в режим *off-line*, і завантажити отриману хроматограму.

1. У режимі *on-line* проглядають інформацію у вікні «*Статус*» хімстанції, а також в інформаційному вікні *Стан* на панелі приладу. Звертають увагу на можливість швидкого редагування параметрів *методу* у вікні «*Статус приладу*», а також у пункті меню «*Прилад / Редагувати параметри*».

2. Вчаться перемикати режими керування пунктами «*Управління методом*», «*Аналіз даних*», «*Інтегрування*».

3. Працюють з хроматограмою в режимі *on-line*. Вчаться збільшувати та зменшувати масштаб по вісіах X та Y, використовуючи стрілки у вікні спостереження сигналів.

4. Працюють з хроматограмою в режимі *off-line*, вчаться завантажувати та накладати хроматограми. Завантажують першу зареєстровану хроматограму Samp_0001.d. Для зміни графічного відображення хроматограми на моніторі використовують пункт меню «*Графіка / Опції сигналу*». Після того як отримали хроматограми індивідуальних речовин,

проводять накладання декількох хроматограм одна на одну. У пункті меню «Графіка / Опції сигналу» підбирають умови накладання та відображення декількох хроматограм в одному вікні.

5. Переконуються у збіжності хроматограм та можливості розділення компонентів суміші.

6. Використовуючи пункт меню «Графіка / Копіювати в буфер обміну», копіюють хроматограми у документ Word. Зберігають файли на носії та використовують їх для самостійної обробки результатів. Для копіювання хроматограм у купі з таблицями інтегрування слід використати опцію *Printscreen*.

6. Ідентифікація компонентів розчину.

Хроматографування парів індивідуальних речовин.

Ідентифікують три компоненти розчину шляхом порівняння часів утримування на хроматограмі проби та хроматограмах парів індивідуальних речовин. Для введення газових проб використовують газоцільний шприц.

1. По-чергово хроматографують 1 мкл парів індивідуальних речовин у методі **L1_initials.m**. Запускають аналіз, використовуючи пункт меню «Виміри / відомості про зразок / Пуск методу», хроматорами при цьому називають **cyhex_1.D**, **tol_1.D** та **octan_1.D** для циклогексану, толуену та *n*-октану, відповідно.

Зверніть увагу - необхідно багаторазово та ретельно промити шприц повітрям перед введеннем парів нової речовини.

2. Ідентифікують речовини у пробі, користуючись пунктом меню «Ідентифікація аналітів».

7. Вимкнення приладу.

Вимикають одразу після отримання останньої хроматограми.

1. У режимі хімстанції **on-line** завантажують метод **GC_OFF.m** (пункт меню «Метод / Завантажити метод...»). Після завантаження цього методу прилад отримує команду на вимкнення та охолодження детектора та інжектора, на зупинку потоків через детектор, охолодження термостату.

2. Проглядають та запам'ятовують параметри Методу, який використали для вимкнення приладу.
3. Закручують вентилі на балонах з повітрям та воднем.
4. Після зменшення температури детектора та інжектора <80°C вимикають хімстанцію, вимикають комп'ютер.
5. Вимикають прилад (кнопка на панелі приладу).
6. Перекривають балон з гелем.

8. Оформлення звіту.

У розділі 2 (див. стор.5) мають бути оформлені:

- ✓ таблиця 1 – «Температури кипіння і часи утримування»,
- ✓ рисунок 1 – «Хроматограмми сполук»,
- ✓ таблиця 2 – «Характеристики піків та ефективності колонки»,
- ✓ обговорення: про кореляцію температур кипіння і часів утримування, про ідентифікацію, про ефективність.

Таблиця 1.
Температура кипіння і час утримування сполук

Розчин/сполука	$T_{\text{кип}}$, °C	t_R , хв
Циклогексан		
Толуен		
<i>n</i> -Октан		
Проба 1 пік		
2 пік		
3 пік		

Таблиця 2.
Характеристики хроматографічних піків та ефективності колонки

Компонент	Характеристики піків				Обчислені характеристики			
	t_R , хв	h , пА	$w_{0,5}$, хв	F_s	H , см	N	N_m шт/м	R_s

Контрольні запитання

1. Який сенс поміщено в термін «*метод*» у хімстанції хроматографу?
2. Назвіть порядок дій для вмикання хроматографу.
3. До чого призводить наявність пухирців повітря в аліквоті рідкої проби?
4. До чого приведе затримка голки шприца в інжекторі, повільне введення проби, затримка у натисканні клавіші *start*?
5. Поясніть фізичний сенс коефіцієнту ємності.
6. Дайте визначення мертвого часу системи.
7. Назвіть об'єм лайнера інжектора у хроматографі Agilent.

Лабораторна робота №2

Оптимізація хроматографічного розділення шляхом зміни швидкості потоку газу-носія

Мета. Визначити ефективність капілярної колонки за різних швидкостей потоку газу-носія та вибрати оптимальну швидкість потоку.

Завдання, які слід виконати у ході лабораторної роботи

1. Для визначення мертвого часу колонки отримати хроматограми газу метану за швидкостей потоку газу-носія від 0,5 до 5 мл/хв.
2. Отримати хроматограми проби за швидкостей потоку газу-носія від 0,5 до 5 мл/хв.
3. За експериментальними даними обчислити параметри ефективності колонки.
4. Побудувати графіки залежності висоти, еквівалентної теоретичній тарілці, від швидкості потоку газу-носія.

Теоретичні відомості

Вплив різних дифузійних факторів на розмивання хроматографічної зони у колонці описує дифузійна теорія. Залежність висоти, еквівалентної теоретичній тарілці, (H) від лінійної швидкості газу-носія u описана рівнянням Ван-Деемтера:

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u \quad (10).$$

Графік цієї залежності є гіперболою.

У рівнянні (10) коефіцієнт A характеризує вихрову дифузію молекул, коефіцієнт B відображає внесок поздовжньої дифузії молекул, а коефіцієнт C враховує опір масопереносу в нерухомій фазі. За допомогою дифузійних коефіцієнтів показують вплив дифузійних процесів на розмивання хроматографічної зони в колонці.

Для капілярних колонок, в яких відсутня вихрова дифузія молекул, справедливим є рівняння Голея:

$$H = \frac{B}{u} + C \cdot u \quad (11).$$

Коефіцієнти А, В і С є збірними, містять у собі декілька параметрів, зокрема коефіцієнт дифузії досліджуваних молекул, який важко, а то й не можливо визначити для дифузії молекул у твердій фазі. Тому оптимальну швидкість потоку рухомої фази знаходять експериментально: отримують хроматограми проби за різних швидкостей потоку газу-носія, обчислюють число тарілок й висоту, еквівалентну теоретичній тарілці, будують графік залежності ВЕТТ від швидкості потоку газу-носія, за яким визначають оптимальну швидкість потоку, як таку, що відповідає найменшій ВЕТТ на графіку.

Оптимальні швидкості потоку зазвичай дорівнюють ~12 см/сек для N₂, ~20 см/сек для He, та ~40 см/сек для H₂

Формули для обчислень показників ефективності колонки див. у теоретичній частині лабораторної роботи №1.

Експериментальна частина

Прилади, посуд, реактиви

1. Газовий хроматограф Agilent Technologies з капілярним інжектором, з полуменево-іонізаційним детектором.
2. Капілярна колонка HP-5 (30 м × 320 мкм × 0,25 мкм, 5 % Phenyl-methyl-siloxane),
3. Балони з газами: гелій ТУ 51-40-80, водень технічний А ГОСТ 3022-80, повітря стиснене ГОСТ 17433-80 клас 0.
4. Мікрошипци.
5. Суміш: циклогексан, толуен, *n*-октан у метанолі.
6. Метан (парова фаза рідкого наповнювача запальнічки, перенесеного у віалу).

Порядок виконання

1. Хроматографування розчинів за різних швидкостей потоку газу в колонці.

Хроматографують аліквоту проби, а також метану за різних швидкостей потоку газу-носія: 0,5; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0 і 5,0 мл/хв.

1. Вмикають хроматограф і хімстанцію, як описано в лабораторній роботі №1.

2. Створюють новий метод на основі методу L1_initials.m, і зберігають його під назвою L2_initials.m.

3. У вікні хімстанції «ПРИЛАД /Редагувати параметри» задають такі параметри методу:

ТЕРМОСТАТ

Режим:	градієнтний
Температурна програма:	40°C (2 хв), 40-55°C (10°C/хв)

КОЛОНКА

Режим потоку газу-носія:	постійний потік
Швидкість потоку газу-носія:	змінна - від 0,5 до 5,0 мл/хв

ВИПАРНИК

Температура:	250°C
Режим роботи:	з розділенням потоку (Split) 1:50

ДЕТЕКТОР

Температура:	300°C
Швидкість потоку повітря:	350 мл/хв
Швидкість потоку водню:	30 мл/хв
Допоміжний (make-up) газ:	гелій, 25 мл/хв

4. У пункті хімстанції «Прилад / Редагувати параметри» у методі задають швидкість потоку газу-носія 0,5 мл/хв. У робочий журнал записують відповідну лінійну швидкість потоку.

5. Застосовують створений метод для хроматографування метану (1...5 мкл парової фази відбирають з віали, попередньо заповненої із запальнички). Запускають метод натисненням

пункту меню «*Вимірювання / Відомості про зразок / Пуск методу*». Файл з хроматограмою метану називають **0_5_m_1.D**.

6. Натискають у хімстанції пункт «*Прилад / Редагувати параметри*», у *методі* задають швидкість потоку газу-носія 1 мл/хв. Записують відповідну лінійну швидкість потоку. Знову хроматографують метан.

Після появи на моніторі піка метану розгонку зупиняють натисканням пункту меню «*Вимірювання / Стоп аналіз, Введення / Послідовність*».

Записують час виходу метану (мертвий час).

7. Почергово змінюють швидкість потоку газу-носія (1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 мл/хв), повторюють крок 5 і ще п'ять разів хроматографують метан.

Очікуваний діапазон зміни часів виходу метану від 7 до 1 хв.
Записуйте в робочий журнал часи виходу метану!

8. Натискають у хімстанції пункт «*Прилад / Редагувати параметри*», у *методі* задають швидкість потоку газу-носія 0,5 мл/хв. Записують відповідну лінійну швидкість потоку.

9. Застосовують створений метод для розгонки проби (1 мкл рідкої фази проби). Запускають *метод* натиснувши пункт меню «*Вимірювання / Відомості про зразок / Пуск методу*». Файл з хроматограмою проби називають **0_5_s_1.D**.

10. Знов змінюють швидкість потоку в пункті меню «*ПРИЛАД / Редагувати параметри*» на 1 мл/хв і розганяють розчин проби.

Після виходу піка октану розгонку суміші зупиняють натисканням пункта меню «*Вимірювання / Стоп аналіз / Введення/ Послідовність*».

Записують часи утримування, висоти і площині піків.

11. Почергово змінюють швидкість потоку газу-носія (1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 мл/хв), повторюють крок 8 і ще п'ять разів хроматографують розчин проби.

Очікуваний діапазон зміни часів утримування від 10 до 4 хв.
Записуйте часи утримування, висоти і площині піків.

2. Оформлення звіту

У розділі 2 слід оформити:

- ✓ Табл. 1. «Залежність характеристик хроматограми і параметрів ефективності від лінійної швидкості потоку газу-носія».
- ✓ Рис 1. На одному рисунку криві у координатах $H = f(u)$ і $H_{\text{еф}} = f(u)$ для кожного досліджуваного компоненту.
- ✓ Табл. 2. «Мінімальні величини $H_{\text{мін}}$, $H_{\text{ефмін}}$ й $u_{\text{опт}}$ ».
- ✓ Рисунки «Залежність висоти, площи піку, фактору симетрії від лінійної швидкості потока газу-носія» для кожного компонента.
- ✓ Обговорення: вплив швидкості потоку на ефективність колонки; чому величина H різна для різних сполук; вибір оптимальної швидкості; залежність висоти і площи піків від швидкості потоку для полуменево-іонізаційного детектора.

Таблиця 1.
Залежність характеристик хроматограми і параметрів ефективності від лінійної швидкості потоку газу-носія

Компонент	ω , мл/хв	u , см/хв	t_R , хв	t_0 , хв	$w_{0,5}$, хв	$N_{\text{еф}}$	$H_{\text{еф}}$, мм
Циклогексан	0,5						
	1,5						
	2,0						
	3,0						
	4,0						
	5,0						

Таблиця 2.
Мінімальні величини H , $H_{\text{еф}}$ й $u_{\text{опт}}$ потоку газу-носія

Показник	Одиниці вимірювання	Компоненти		
		Циклогексан	Толуен	<i>n</i> -Октан
$H_{\text{мін}}$	мм			
$H_{\text{еф мін}}$	мм			
$u_{\text{опт}}$	см/хв			

Контрольні запитання

1. Напишіть рівняння Ван Десемтера. Поясніть фізичний сенс коефіцієнтів цього рівняння.
2. Опишіть практичний спосіб визначення оптимальної швидкості потоку газу-носія в колонці.
3. Поясніть чому капілярні колонки є ефективнішими за набивні?
4. Напишіть формулу для обчислення фактора симетрії хроматографічного піка. Який діапазон величин фактора симетрії піків є допустимим для аналізу?

Лабораторна робота № 3.

Вплив кількості речовини на симетрію хроматографічних піків та роздільну здатність системи у газовій хроматографії

Мета. Дослідити вплив кількості введеної в колонку речовини на симетрію хроматографічних піків та роздільну здатність капілярної колонки.

Завдання, які слід виконати у ході лабораторної роботи

1. Виконати розгонку проб з різними концентраціями компонентів за однакових умов хроматографування, інтегрувати отримані хроматограми.
2. Отримати таблиці інтегрування та провести порівняння залежності хроматографічних параметрів від концентрації досліджуваних речовин.

Теоретична частина

Капілярні колонки малого діаметру ($<0,5$ мм) є високоекспективними, придатними для проведення швидкісного кількісного аналізу, дозволяють досягти високої роздільної

здатності. Певним обмеженням при використанні капілярних колонок є низька ємність (Q_s) таких колонок по пробі.

Перевищення ємності колонки по пробі називають *перевантаженням*. Перевантаження колонки виливається у значне погіршення симетрії хроматографічних піків з подальшим можливим погіршенням роздільної здатності колонки. За широкими й асиметричними хроматографічними піками не можливо виконати правильне якісне і кількісне визначення.

У даній лабораторній роботі досліджують вплив зменшення кількості речовини, що потрапляє в колонку, на симетрію хроматографічних піків.

Експериментальна частина

Прилади, посуд, реактиви

1. Газовий хроматограф Agilent Technologies з капілярним інжектором, з полуменево-іонізаційним детектором.
2. Капілярна колонка HP-5 (30 м x 320 мкм x 0,25 мкм, 5 % Phenyl-methyl-siloxane).
3. Балони із газами: гелій газоподібний ТУ 51-40-80, водень технічний А ГОСТ 3022-80, повітря стиснуте ГОСТ 17433-80 клас 0.
4. Мікрошприц.
5. Розчини проби циклогексану, толуену й *n*-октану різної концентрації в метанолі. Розчини з меншою концентрацією готують розбавленням стандартного розчину метанолом.

Порядок виконання

1. Хроматографування розчинів з різною концентрацією компонентів

1. Завантажують метод **L1_initials.m**, і зберігають його під новою назвою **L3_initials.m**. (обирають пункт меню «*Метод / Зберегти метод як...*» й указують назву).

2. Обирають вікно меню «*Метод / Редагувати метод повністю...*» і перевіряють, щоб усі робочі параметри співпадали із заданими у лабораторній роботі №1.

3. Застосовуючи метод **L3_initials.m** послідовно хроматографують розчини, почавши з розчину з найменшою концентрацією. Файли з хроматограмами можна назвати **Conc1.D, Conc2.D, Conc3.D, Conc4.D**, відповідно.

Звертають увагу на вплив концентрації введеного розчину на форму хроматографічного піка.

2. Інтегрування хроматограм.

1. Отримані хроматограми інтегрують.

Для інтегрування переходять у режим *off-line* одразу після першої інжекції стандарту. Поки відбувається чергова розгонка проби, інтегрують попередню хроматограму в режимі *off-line*.

Процедура 1. Інтегрування

1. У розділі «Аналіз даних» завантажують метод **L3_initials.m** та зберігають його під новою назвою **L3i_initials.m** («Файл / зберегти як метод...»).
2. У розділі «Аналіз даних» завантажують отриману хроматограму.
3. Відкривають пункт меню «Умови інтегрування» і підбирають параметри інтегрування, змінюючи їх у таблиці параметрів «*FID: Спеціальна*».
4. Змінюють параметри «*ухил-чутливість, відкидана висота, відкидана площа*» та інші, слідкуючи за їхнім впливом на результати інтегрування: кількість піків, площу піків. Додають у таблицю «Умови інтегрування» рядки «*час початку і завершення інтегрування*».

Редагуванню параметрів інтегрування передує реєстрація хроматограм, оскільки підбір правильних умов інтегрування є можливим тільки тоді, коли є хроматограма. Таблиця «Умови інтегрування» є частиною методу, тому після її зміни метод слід знову зберегти.

Таблиця «Умови інтегрування» (її параметри та результати) не є частиною файлу даних самої хроматограми - не зберігається з ним.

2. Записують часи утримування, площині піків, фактори симетрії, ширини піків у робочий журнал.

3. Розміщують хроматограми в одному вікні та копіюють їх у документ Word за допомогою опції «Графіка / Копіювати в буфер обміну».

3. Оформлення роботи.

У звіті мають бути:

- ✓ Табл. 1 – «Результати аналізу»

Концентрація	t_R , хв	S , пА·с	h , пA	$w_{0,5}$, хв	F_s	N , 10^n	H , см
--------------	---------------	---------------	-------------	-------------------	-------	-----------------	----------

- ✓ рис. 1 – «Хроматограми за різних концентрацій сполук»;
- ✓ табл. 2 – «Критерій розділення R_s за різних концентрацій компонентів»;
- ✓ обговорення впливу концентрації компонентів на час утримування, площину, ширину, висоту, симетрію піків.

Контрольні питання

1. Яким чином залежить форма хроматографічного піка речовини від її кількості в колонці?
2. Яким чином можна зменшити перевантаження колонки?
3. Чи змінюється час утримування речовини зі збільшенням її кількості у колонці?
4. Яким чином змінюється площа хроматографічного піка зі збільшенням кількості речовини у колонці?
5. Яким чином змінюється ширина хроматографічного піка зі збільшенням кількості речовини у колонці?
6. Яким чином змінюється висота хроматографічного піка зі збільшенням кількості речовини у колонці?
7. Яким чином змінюється симетрія хроматографічного піка зі зменшенням кількості речовини у колонці?

Лабораторна робота № 4.

Газохроматографічний кількісний аналіз розчину з відомими компонентами. Обчислення методом зовнішнього стандарту

Мета. Виконати кількісний аналіз розчину з відомими компонентами методом зовнішнього стандарту.

Завдання, які слід виконати у ході лабораторної роботи

1. Виконати розгонку градуювальних розчинів та інтегрування отриманих хроматограм.
2. Ознайомитися з процедурою створення у хімстанції калібрувальної таблиці.
3. Виконати три хроматографування проби, інтегрування отриманих хроматограм.

Теоретична частина

Форма ідеального хроматографічного піка підпорядковується нормальному (гаусовому) розподілу незалежних величин. Він має вісь симетрії, гостру верхівку, гілки піка асимптотично наближаються до базової лінії.

Обчислити площу під гаусовою кривою можна за формулою:

$$S = 1,064 \cdot h \cdot w_{0,5} \quad (12).$$

Точність обробки хроматограм з асиметричними піками є меншою за точність обробки симетричних піків. В умовах реальної хроматографії у першому наближенні хроматографічний пік можна вважати гаусовим, якщо відношення $w_o/w_{0,5} = 1,67 \dots 1,73$.

При більших відхиленнях форми хроматографічного піку від гаусової зміну їхньої симетрії характеризують *фактором симетрії* (F). Прийнято припустимим виконувати кількісний аналіз за хроматограмою, на якій хроматографічні піки всіх компонентів досліджуваної суміші мають F у межах $0,7 \dots 1,5$.

Важливою задачею для виконання кількісного визначення речовин є градуування хроматографічного приладу - встановлення точної числової залежності між сигналом детектора і вмістом речовини.

Залежно від природи і складу досліджуваної суміші, мети та умов визначення речовин розрізняють три методи обробки результатів аналізу: внутрішнього нормування, внутрішнього стандарта, зовнішнього стандарта.

У даній лабораторній роботі застосовуємо метод зовнішнього стандарта - градуувального графіка.

У методі градуувального графіка - зовнішнього стандарта - застосовують лінійну залежність площини хроматографічного піка від кількості відповідної речовини у суміші. Для побудови градуувального графіка хроматографують декілька (від 2 до 5) стандартних розчинів з відомим збільшуваним вмістом визначуваної речовини. Для цього у колонку вводять однакові об'єми проби. Хімстанція обчислює площини відповідних хроматографічних піків і за цими даними будує графік залежності, наприкл., $S_i = f(C_i)$,

де S_i – площа хроматографічного піка, C_i - концентрація i -того компонента у суміші.

Після цього, на хроматограмі досліджуваної суміші вимірюють площину хроматографічного піка визначуваного компонента. За градуувальним графіком знаходить концентрацію (C_i).

Цей метод потребує точного за масою або об'ємом дозування всіх речовин як при хроматографуванні стандартів, так і досліджуваних сумішей.

Експериментальна частина

Прилади, посуд, реактиви

1. Газовий хроматограф Agilent Technologies з полуменево-іонізаційним детектором.

2. Капілярна колонка HP-5 (30 м × 320 мкм × 0,25 мкм, 5 % Phenyl-methyl-siloxane),
3. Балони із газами: гелій ТУ 51-40-80, водень технічний А ГОСТ 3022-80, повітря стиснене ГОСТ 17433-80 клас 0.
4. Мікрошприц.
5. Розчини суміші з різною концентрацією компонентів у метанолі.

Порядок виконання

1. Хроматографування розчину проби.

1. Завантажують метод **L1_initials.m**, і зберігають його під новою назвою **L4_initials.m**. (обирають пункт меню «*Метод / Зберегти метод як...*» і вказують назву).
2. Обирають пункт меню «*Метод / Редагувати метод повністю...*» і перевірять, щоб усі робочі параметри збігалися із заданими у лабораторній роботі №1.
3. Обирають пункт меню «*Відомості про зразок*» та заповнюють інформацію в активному вікні (див. процедуру 4 в лаб. №1). Файл даних називається **Samp1_1.D**. В активному вікні натискають пункт меню «*Пуск методу*».
4. Відбирають шприцем 1 мкл проби, попередньо 5-10 раз промивши шприц досліджуваним розчином, та видаливши з нього бульбашки повітря.
5. Натискають клавішу **Preprun** на панелі приладу. Після появи на табло приладу **Статус: Ready for injection**, (на екрані відповідає зеленому індикатору «ready»), вводять пробу з наступним миттевим натисканням клавіші **Старт**.
6. Після розгонки хроматограми переходят у режим хімстанції *off-line*. Завантажують отриману хроматограму в методі **L4_initials.m**, підбирають умови інтегрування та зберігають метод під новою назвою **L4i_initials.m**.
7. Після закінчення розгонки чекають на охолодження термостату (до **Статус: Ready**) та повторюють процедуру аналізу ще двічі, починаючи з заповнення пункту меню «*Відомості про зразок*» (крок 3).

2. Хроматографування градуювальних розчинів.

1. У керувальному режимі хімстанції у методі **L4_initials.m** хроматографують 1 мкл градуювальних розчинів, починаючи з розчину з найменшою концентрацією. Розгонку кожного розчину виконують двічі. Файли хроматограм називають, напр., **k1_1.D** и **k1_2.D**, що відповідає першому і другому аналізу першого градуювального розчину.

2. У режимі хімстанції *off-line* в методі **L4i_initials.m** переходят у розділ «*Аналіз даних*» і по-чергово завантажують хроматограми градуювальних розчинів. Перевіряють якість інтегрування, починаючи з хроматограми розчину з найменшою концентрацією, за необхідності - редагують параметри інтегрування. Якщо параметри інтегрування змінено, метод **L4i_initials.m** знову зберігають.

3. Підбирають умови, за яких відбувається інтегрування тільки 3-х піків аналітів, але не шумів.

4. Записують або копіюють таблиці інтегрування кожної хроматограми

3. Оформлення звіту.

У розділі 2 має бути:

- ✓ Табл. 1 – «Температури кипіння, часи утримування»,
- ✓ Табл. 2-4 – «Дані для побудови градуювальних графіків»,
- ✓ Рис. 1 – градуювальні графіки (усі на одному рис.),
- ✓ Табл.5 – «Характеристики градуювальних графіків» (рівняння запишіть у форматі $S = (b \pm \Delta b) + (a \pm \Delta a) \cdot C$),

для цього у програмі Origin або Excel запросіть рівняння прямих, коефіцієнти кореляції; за довірчими інтервалами коефіцієнтів рівнянь обчисліть межі виявлення (МВ) та (МКВ) кількісного визначення,

- ✓ Табл.6 – «Результати обчислень концентрації аналіту в пробі та їх статистична обробка»,
- ✓ обговорення: про правильність та збіжність результатів кількісного визначення,

Таблиці 2...4.

Дані для побудови градуювального графіка компонента

Розчин	C , мкг/мл	№ аналізу	S , пА·с	S_{sep} , пА·с
Стандарт 1		1		
		2		
Стандарт 2		1		
		2		
Стандарт 3		1		
		2		
проба		1		---
		2		
		3		

Таблиця 5.

Характеристики градуювальних графіків

Компонент	Рівняння	Коефіцієнт кореляції	МВ, мг/л	МКВ, мг/л

Таблиця 6.

Результати обчислень концентрації аналіту в пробі та їх статистична обробка

Речовина	\bar{X} , мг/л	s	$D, \%$	s_r	$\Delta\bar{X}$, мг/л

 $n = 3, P = 0,95, t = \dots$.**Контрольні питання**

- Опишіть метод зовнішнього стандарту.
- Напишіть фізичний сенс коефіцієнта кореляції градуювальної прямої, коефіцієнтів у рівнянні прямих?
- Чи можна створювати калібрувальні таблиці в режимі хімстанції on-line та в off-line газового хроматографа Agilent?
- Які параметри хроматографічних піків надає хімстанція в таблиці інтегрування?
- Яким способом детектують речовини в цій роботі?

Лабораторна робота №5.

Якісне визначення речовин методом високоефективної рідинної хроматографії. Оптимізація ефективності колонки

Мета. Провести якісний аналіз розчину, що містить відомі компоненти; оптимізувати методику за складом елюенту.

Завдання, які слід виконати у ході лабораторної роботи

1. Ознайомитися з будовою рідинного хроматографа.
2. Ознайомитися з процедуроюувімкнення рідинного хроматографа.
3. У неактивному режимі хімстанції інтегрувати наявні хроматограми.
4. Провести ідентифікацію компонентів.
5. На основі часів утримування, площі піків, факторів симетрії, висоти, еквівалентної теоретичній тарілці, вибрать оптимальний склад елюенту.

Теоретична частина

Передбачити селективність сорбції речовин та порядок їхнього елюювання з колонки у методі ВЕРХ можна на підставі відомостей про полярність цих речовин, величину $\log P$ – коефіцієнту розподілу речовини у системі вода/октанол за 25°C , розчинності у воді, наведені у табл.1.

Таблиця 1
Деякі параметри речовин у стандартному зразку
Agilent Technologies (01080-68704)

Сполука	$\log P$	Розчинність у воді за 25°C , моль/л	Діелектрична стала
Диметилфталат	$1,62 \pm 0,25$	0,076	Не відома
Диетилфталат	$2,69 \pm 0,25$	$3,9 \cdot 10^{-3}$	Не відома
Біфеніл	$3,98 \pm 0,23$	$1,1 \cdot 10^{-4}$	$2,71 \pm 0,01$
<i>o</i> -терфеніл	$5,77 \pm 0,28$	$2,8 \cdot 10^{-6}$	$2,85 \pm 0,01$

Також на селективність сорбції речовин у методі ВЕРХ впливає склад та процентне співвідношення розчинників у рухомій фазі.

Провівши хроматографування з рухомими фазами, які різняться за процентним відношенням розчинників, та порівнявши між собою отримані часи утримування, площини піків, фактори симетрії, висоти, еквівалентні теоретичні тарілці, обирають оптимальний склад елюєнту.

Експериментальна частина

Прилади, посуд, реактиви

1. Рідинний хроматограф Agilent 1200.
2. Капілярна колонка Eclipse XDB-C18 (нерухома фаза - силікагель з прищепленими групами C18, з подвійним ендкеппінгом), (4,6 мм x 150 мм, діаметр зерна 5 мкм).
3. Мікрошприц.
4. Проба. Ізократичний стандартний зразок від Agilent Technologies (01080-68704): 0,15 % диметилфталат, 0,15 % диетилфталат, 0,01 % біфеніл і 0,03% *o*-терфеніл.

Порядок виконання

1. Ознайомлення з розташуванням блоків приладу.

2. Увімкнення хроматографу і завантаження хімстанції.

Ознайомитися з графічним інтерфейсом хімстанції і параметрами стартового методу (Start.m).

Параметри методу

Об'єм проби	5 мкл
Швидкість потоку	2 мл/хв
Склад елюенту	
Ізократичний режим 1	CH ₃ CN : H ₂ O = 55:45%. StopTime 18 хв

StopTime - час закінчення реєстрації сигналів детектора

Ізократичний режим 2	CH ₃ CN: H ₂ O 65:35%. StopTime 8,4 хв
Ізократичний режим 3	CH ₃ CN : H ₂ O 75:25%. StopTime 5 хв
Температура колонки	40 °C
ДЕТЕКТОР діодно-матричний	
Умови :	Сигнал А
довжина хвилі	254 нм
ширина діапазону	4 нм
довжина хвилі фону	не задавати
ширина щілини	4 нм
збереження спектрів	все (190-400 нм), з кроком 2 нм, <i>StopTime</i> ні, <i>Post time</i> ні
Необхідна лампа	УФ
Ширина піку	> 0,1 хв, час відгуку 2 сек
Автобалансування	Prerun (перед аналізом)

Теоретично ознайомитися з процедурою заміни розчинника.

3. Інтегрування хроматограм у режимі off-line.

Досліджувані суміш хроматографували у трьох ізократичних методах, що різняться за співвідношенням розчинників у рухомій фазі.

Завантажують хроматограми, одержані в кожному з ізократичних методів (файли L1_Iso1_1.d, L1_Iso2_1.d і L1_Iso3_1.d), копіюють їх у Word. Хроматограми інтегрують за однакових умов, записують часи утримування, площину симетрію і напівширину піків усіх аналітів.

4. Ідентифікація речовин за часами утримування.

Порівнюють часи утримування хроматографічних піків компонентів зразку з паспортом зразку.

5. Оформленню звіту.

У звіті мають бути:

- ✓ Рис. 1 – «Хроматограма стандартного зразка»,
- ✓ Табл.1 – «Температури кипіння та діелектричні сталі речовин»,
- ✓ Табл. 2

Таблиця 2.

Параметри піків

Аналіт	t_R , хв	$w_{0,5}$, хв	F	S	Співвідношення розчинників $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O}$ у рухомій фазі
					55:45
					65:35
					75:25

✓ Табл. 3 -

Таблиця 3.

Ефективність розділення за різного співвідношення розчинників у рухомій фазі

Аналіт	Співвідношення розчинників $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O}$ у рухомій фазі	N	Н, мм
	55:45		
	65:35		
	75:25		

✓ обговорення:

- ✓ про ідентифікацію речовин,
- ✓ про ефективність набивної колонки у ВЕРХ,
- ✓ про вплив складу елюєнту на тривалість розділення, ефективність розділення, симетрію піків,
- ✓ про вибраний склад елюєнту.

Контрольні запитання

1. Який тип нерухомої фази застосовують у даній лабораторній роботі?
2. Що означає ізократичний режим елюювання?
3. Яким чином впливає співвідношення розчинників різної полярності на часи утримування речовин?
4. Чи впливає склад елюєнту на величину сигналу (площу піків)?

ЛІТЕРАТУРА

1. *Лисенко О.М., Набиванець Б.Й.* Вступ до хроматографічного аналізу. К.: “Корвін Пресс”, 2005.
2. *Ракс В.А., Есауленко А.М.* Сучасна хроматографія на гребені хвилі прогресу. К.: 2014.
3. *Лисенко О.М., Ковальчук Т.В., Левчик В.М., Зайцев В.М.* практикум з газової хроматографії. К.: ВПЦ «Київський університет», 2013.

Навчальний посібник

Лисенко Олена Миколаївна к.х.н.,
Левчик Валентина Михайлівна к.х.н.,
Ракс Вікторія Анатоліївна к.х.н.,
Ковальчук Тетяна Вікторівна

ЛАБОРАТОРНИЙ ПРАКТИКУМ З ОСНОВ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ КОЛОНКОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

до виконання лабораторних робіт