



Современные аспекты хроматографии

Количественный анализ в хроматографии

Минажева Гулшарат Салауатовна – доктор педагогических наук, кандидат химических наук, профессор кафедры АКХиТРЭ

Количественный анализ в хроматографии

По площади пика – площадь пика прямо пропорциональна концентрации
аналита (или массе аналита, попавшей в детектор)



Расчет площади пика

Для всего количественного хроматографического метода необходимо рассчитать площадь пиков. Основу этих расчетов составляет нахождение площади треугольника (триангуляция). Существует несколько способов триангуляции:

- 1) Умножьте высоту пика $\frac{1}{2} h$ на его окончательную ширину μ ;
- 2) Умножьте высоту пика h на половину его окончательной ширины $\mu 0,5$;
- 3) Умножьте половину высоты треугольника (полученного путем рисования боковых линий) h' на его окончательную ширину μ ;

$\frac{1}{2} h \cdot \mu = 0,80 S_{\text{истинно}}$; $h \cdot \mu 0,5 = 0,90 S_{\text{истинно}}$; $\frac{1}{2} h' \cdot \mu = 0,97 S_{\text{истинно}}$; $h \cdot \mu 0,368 = S_{\text{истинно}}$, здесь $S_{\text{истинно}}$ – истинное значение площади пика, полученное с использованием интегратора. На практике $S_{\text{истинно}}$ определяется по следующей формуле:

$S_{\text{истинно}} = h \cdot \mu 0,5$ или **$S_{\text{истинно}} = h \cdot \mu 0,368$** , то есть, его находят путем умножения высоты пика на h/e , здесь e – основание натурального логарифма.

В последнем случае рисовать какие-либо географические фигуры не нужно.

Площадь пика в хроматографии рассчитывается путем интегрирования кривой хроматограммы в пределах пика, который представляет собой область, где концентрация аналита присутствует на значительном уровне.

Процесс расчета площади пика включает следующие шаги:

1. Интегрирование кривой: Сначала проводится интегрирование кривой хроматограммы в пределах пика. Это означает, что площадь под кривой, ограниченной пиком, вычисляется с использованием математических алгоритмов.

2. Коррекция фона: Иногда в хроматограммах могут присутствовать фоновые сигналы или базовый уровень сигнала, которые также учитываются при интегрировании. Обычно это учитывается и вычитается из общей площади пика.

3. Калибровка: Для точного определения площади пика часто используются калибровочные кривые, которые устанавливают соответствие между интенсивностью сигнала и концентрацией аналита.

4. Автоматизация: В современных хроматографических системах процесс интегрирования и расчета площади пика часто автоматизирован с использованием специализированного программного обеспечения, что делает процесс более точным и эффективным.

Точный расчет площади пика важен для количественного определения содержания аналита в образце.

Методы количественного анализа в хроматографии

Нормализация в хроматографии - это процесс коррекции данных, который используется для устранения вариаций в аналитических сигналах, вызванных различными факторами, такими как количественные различия в образцах, изменения в условиях анализа или неоднородности детектора.

Основная идея нормализации - привести данные к стандартному или общему базису, что позволит более точно сравнивать и интерпретировать результаты анализа.

Примеры методов нормализации в хроматографии включают использование внутренних стандартов, коэффициентов восстановления или корректировку интегральных площадей пиков для компенсации различий в объеме образца или условиях анализа.

Нормализация помогает улучшить точность и надежность аналитических данных в хроматографии.

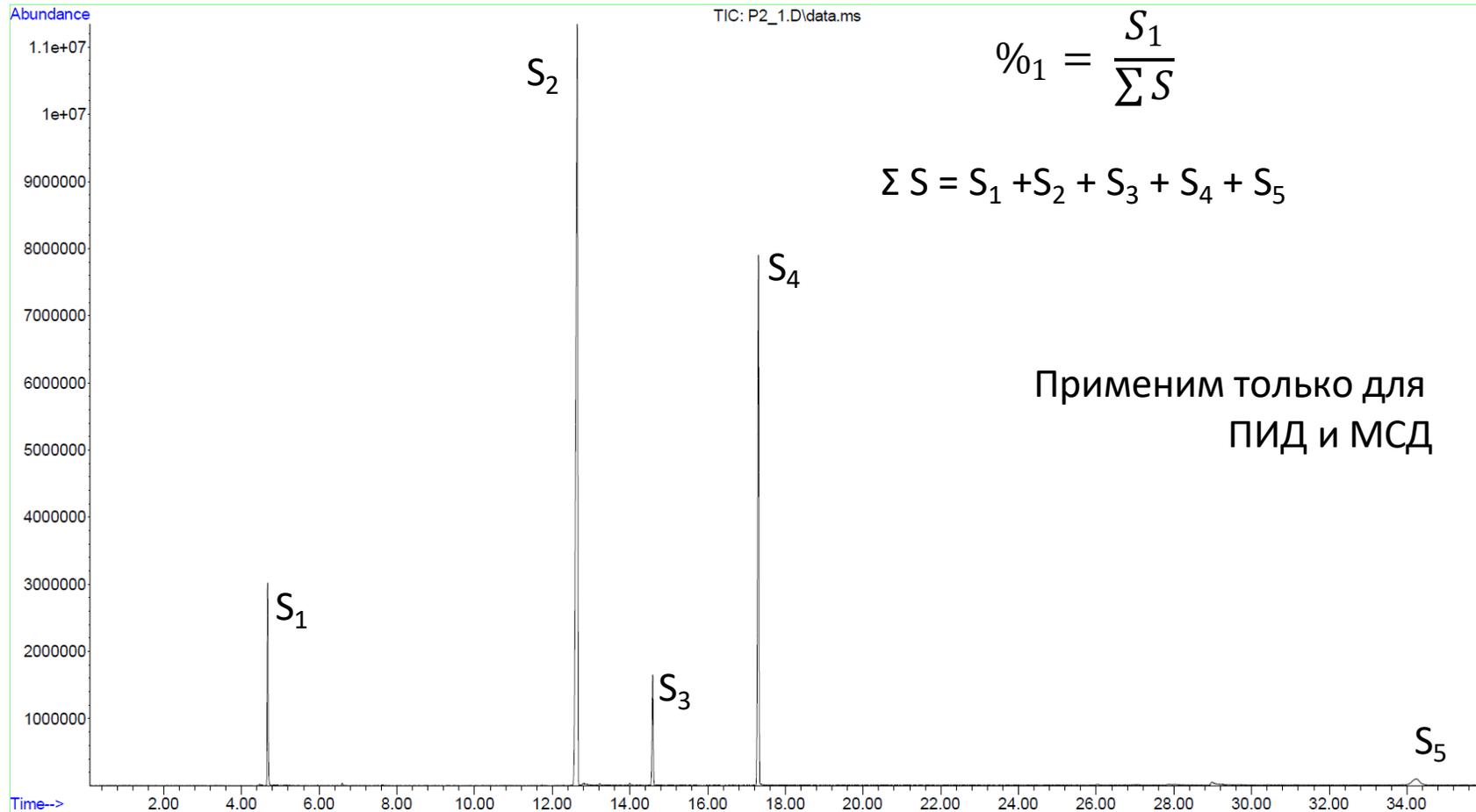
При нормализации – процентное содержание аналита рассчитывают делением площади его пика на сумму всех площадей пиков на хроматограмме МСД и ПИД (МСД – *масс-спектрометрический детектор*, ПИД – *пламенно-ионизационный детектор*).

Калибровка по внутреннему стандарту: $S = f(C)$

Калибровка по внешнему стандарту: $S/S_{\text{вс}} = f(C/C_{\text{вс}})$.

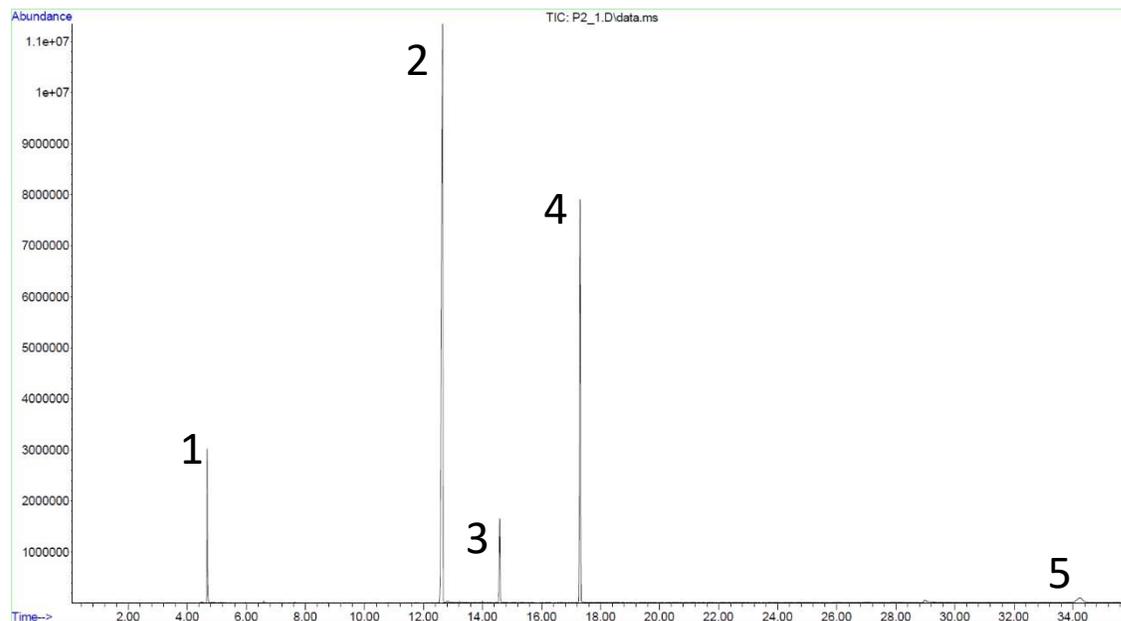
Метод добавок: $S = f(C_{\text{доб}})$.

Нормализация



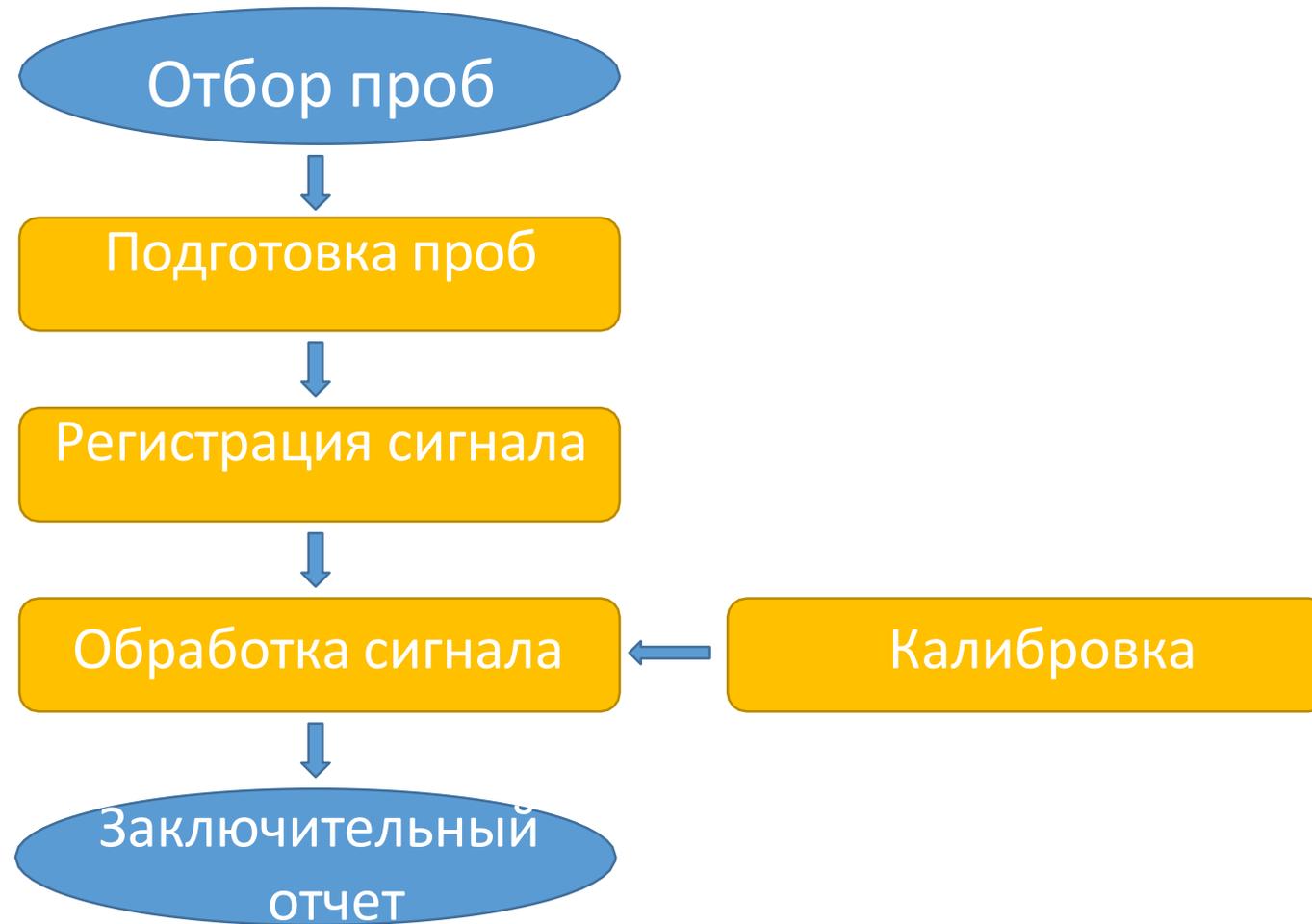
Очень простой и быстрый метод анализа легких нефтяных фракций

Результаты нормализация

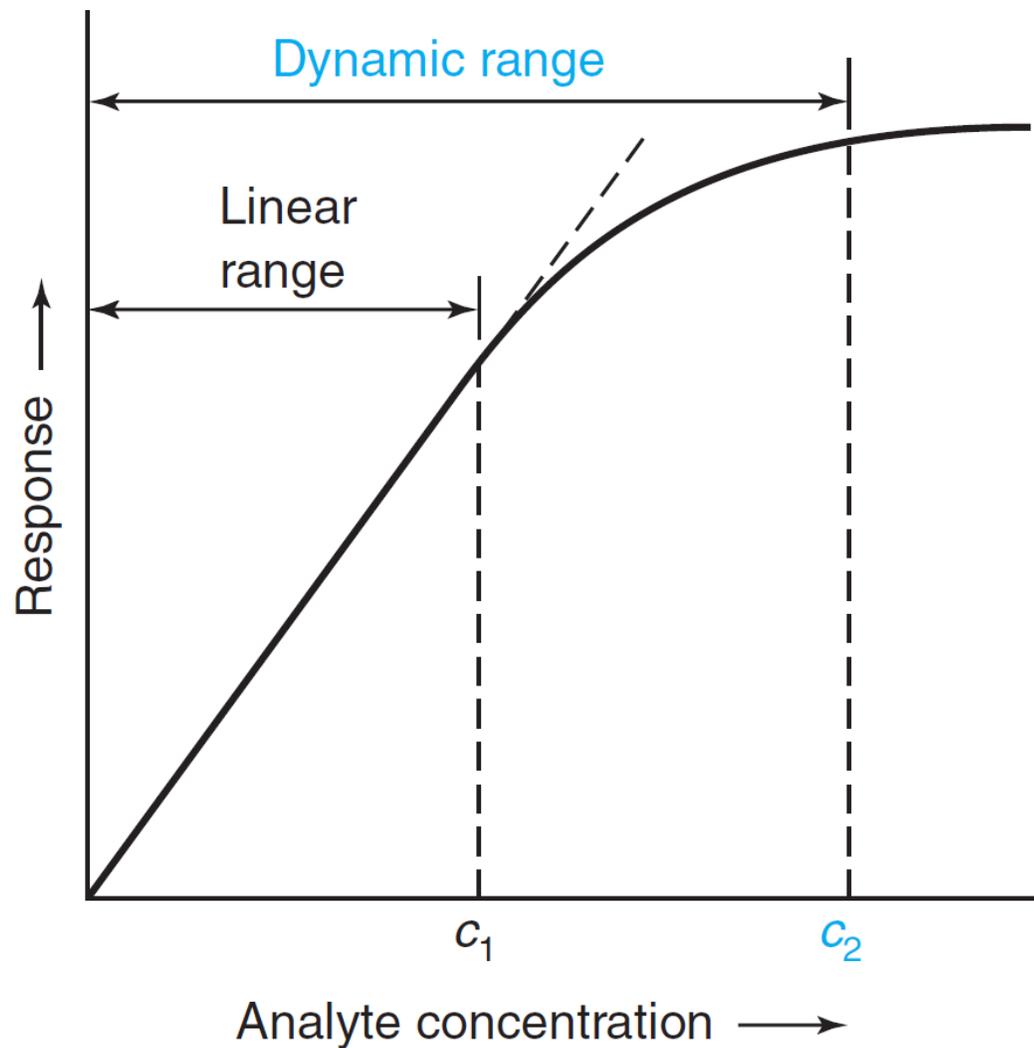


peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	4.675	1305	1318	1352	BB	2992968	49200040	12.88%	7.546%
2	12.645	3572	3606	3629	VB	11324431	382062343	100.00%	58.598%
3	14.585	4144	4163	4184	BB	1637784	33407127	8.74%	5.124%
4	17.306	4921	4945	4992	BB	7882056	175333879	45.89%	26.891%
5	34.251	9731	9812	9893	BB 6	90854	12002277	3.14%	1.841%

Схема анализа



Количественный анализ



Основной принцип:
регистрация (измерение)
аналитического сигнала и
преобразование его в
концентрацию

Общая формула количественного анализа

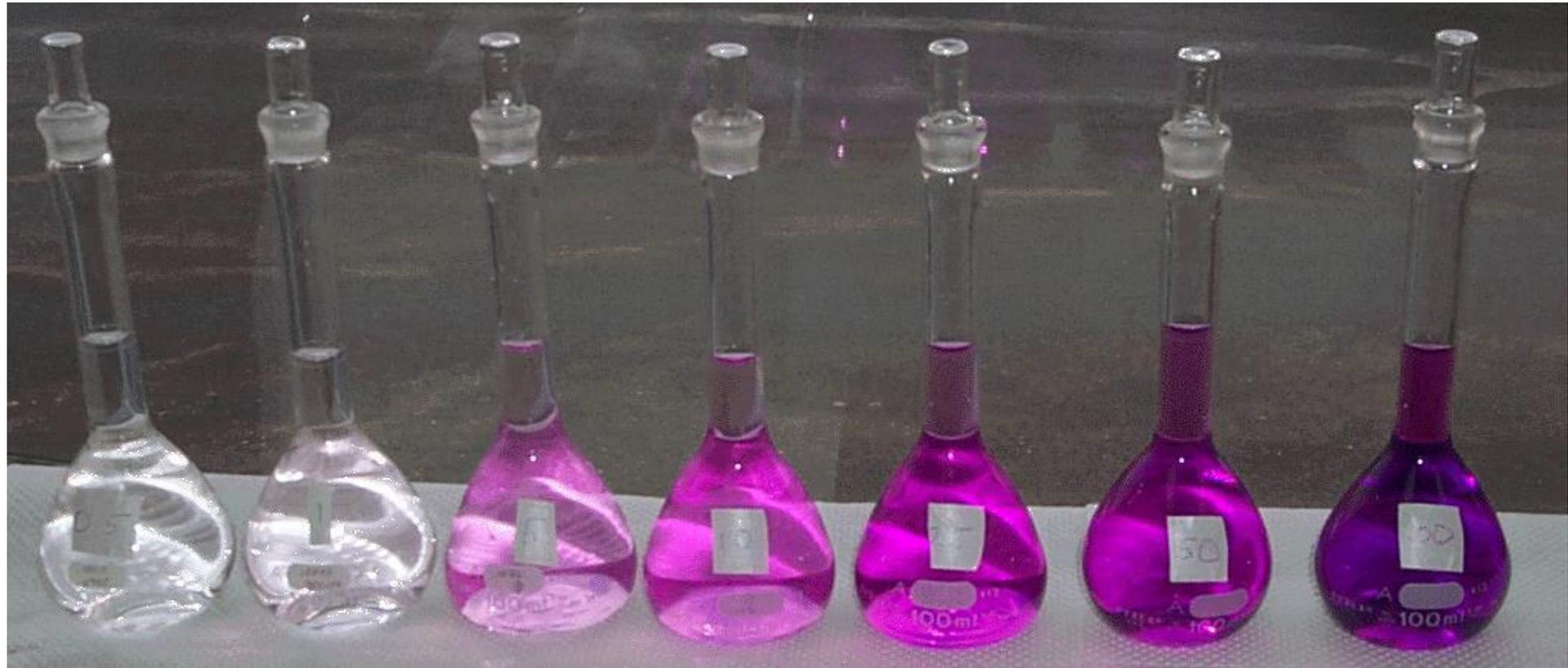
$$S = k \cdot C + b$$

- S – аналитический сигнал
- C - концентрация
- k – фактор чувствительности (пересчет)
- b – коэффициент (для селективных методов - 0)

Сигналы количественного анализа

- Объем титранта в эквивалентной точке
- Масса осадка
- Оптическая плотность
- Ток окисления или восстановления
- Площадь пика

Влияние концентрации аналита на насыщенность цвета образцов



0,5

1,0

5

10

25

50

100

Концентрация аналита, мг/л

Для сигналов качественного анализа

- Цвет или запах (образец, настойка, пламя)
- Температура кипения или плавления
- Образование осадка или выделение газа
- Показатель перелома
- Спектр (поглощение/выведение света, масс-спектр)

Истинная (реальная) формула

$$S = k_1 C_1 + \underbrace{k_2 C_2 + k_3 C_3 + k_4 C_4 + \dots}_b$$

- Для селективных методов: $k_1 \gg k_i$
- При снижении пределов определения повышаются требования к селективности

Методы калибровки

- Внешний стандарт
- Внутренний стандарт
- Метод примесей
- ...
- ...

Калибровка по внутреннему стандарту в хроматографии - это метод, используемый для коррекции аналитических данных путем добавления известного количества стандартного вещества (внутреннего стандарта) к образцу перед анализом.

Вот как происходит процесс калибровки по внутреннему стандарту:

1.Выбор внутреннего стандарта: Сначала выбирается подходящее стандартное вещество, которое добавляется ко всем образцам перед началом анализа. Внутренний стандарт должен быть стабильным, не реагирующим с образцом и легко определяемым в хроматографических условиях.

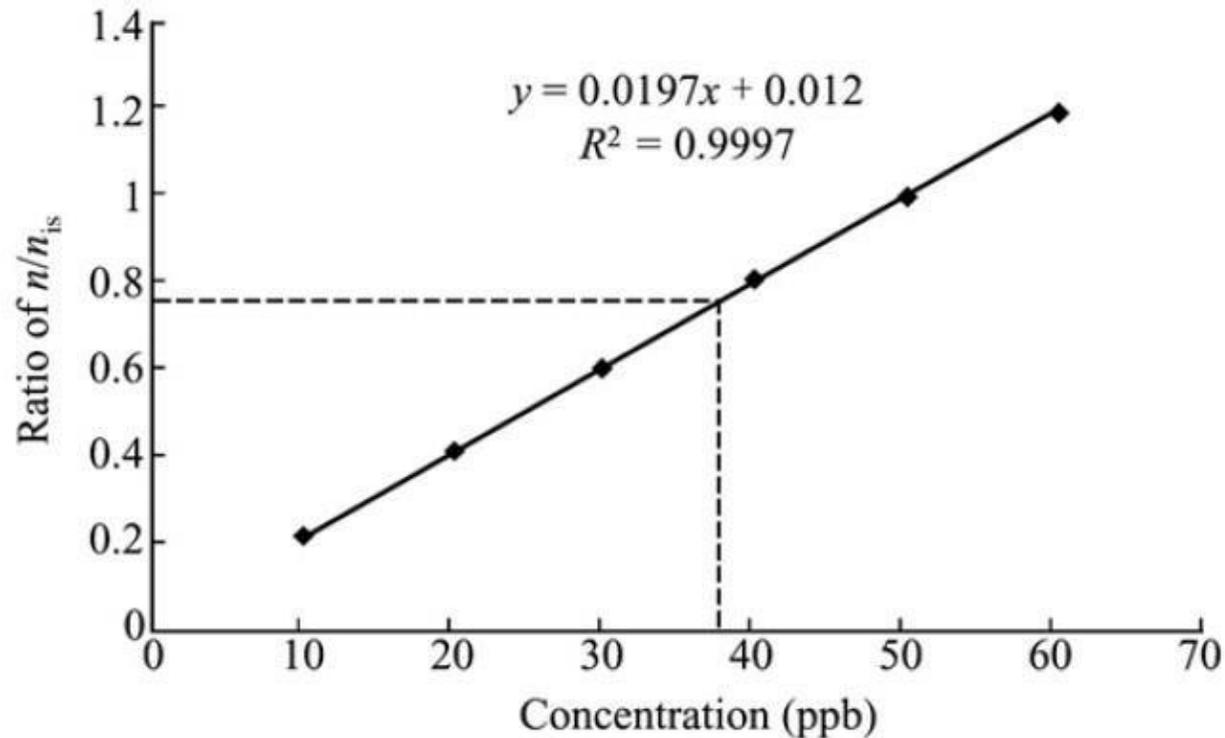
2.Добавление стандарта: Известное количество внутреннего стандарта добавляется в каждый образец или в пробу контрольного раствора.

3.Анализ методом хроматографии: Затем проводится анализ образца методом хроматографии, включая образцы с добавленным внутренним стандартом и контрольные образцы без него.

4.Коррекция данных: Используя данные об аналите и внутреннем стандарте, производится коррекция результатов анализа для учета потерь или изменений, возникающих в процессе подготовки образцов или анализа.

Преимущества калибровки по внутреннему стандарту включают повышение точности и воспроизводимости анализа, компенсацию изменений в условиях анализа и минимизацию влияния факторов, таких как изменения объема образца или условия экстракции.

Калибровка по внутреннему стандарту



К смеси, определяемой по методу внутреннего стандарта, добавляется определенное количество стандартного вещества.

Калибровочный график - связь (зависимость) между соотношением % содержания (концентрации) компонента и высоты (или площади) пиков данного компонента и стандартного вещества.

Калибровка по внешнему стандарту - это метод в хроматографии, который используется для определения концентрации аналита в образце путем сравнения его хроматографических параметров с параметрами стандартных образцов известной концентрации.

Процесс калибровки по внешнему стандарту:

1. Подготовка стандартных растворов: Сначала подготавливаются стандартные растворы аналита различных концентраций. Эти растворы должны быть приготовлены с известной и высокой точностью.

2. Хроматографический анализ: Затем проводится хроматографический анализ стандартных растворов. Для этого используются условия хроматографии, идентичные тем, которые будут использоваться для анализа образцов.

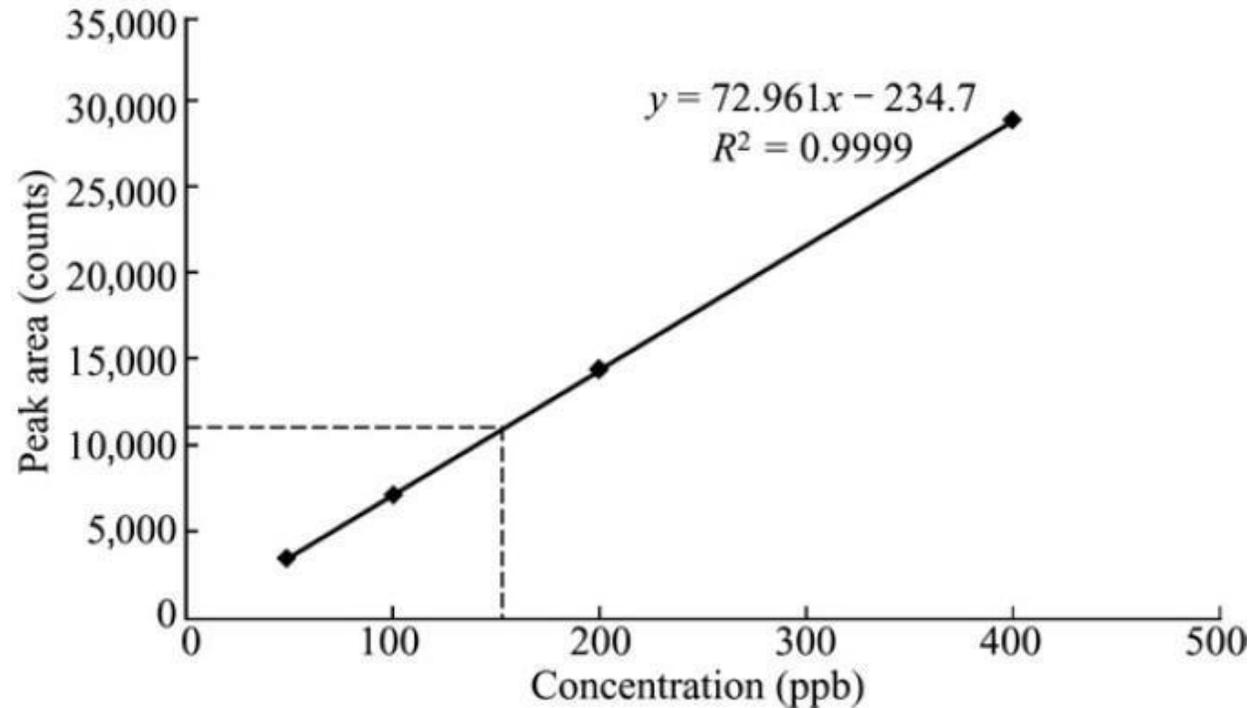
3. Построение калибровочной кривой: По результатам анализа строится калибровочная кривая, где ось X представляет концентрацию стандартных растворов, а ось Y - какой-либо параметр, связанный с аналитом, *например*, площадь под пиком хроматограммы.

4. Анализ образцов: Затем анализируются образцы неизвестной концентрации с использованием тех же хроматографических условий.

5. Определение концентрации образцов: Концентрация аналита в образцах определяется путем сопоставления их хроматографических параметров (*например*, высота или площадь пиков) с калибровочной кривой.

Преимущества калибровки по внешнему стандарту включают относительную простоту и универсальность метода, но он может быть менее точным, чем калибровка по внутреннему стандарту, особенно при изменениях в условиях анализа или проблемах с репрезентативностью образцов.

Калибровка по внешнему стандарту



Получают хроматограмму, а затем в тех же случаях в хроматограф вводят искусственную смесь (ее идентифицируют под площадь пика разыскиваемого компонента) (его концентрация также должна быть близка к концентрации разыскиваемого компонента в определяемой пробе). После идентификации пиков производят расчеты. Этот метод эффективен при выявлении отдельных веществ или простых микроэлементов.

Калибровка по методу добавок, также известная как метод стандартного добавления, является одним из методов калибровки в аналитической хроматографии. Этот метод часто используется для определения концентрации аналитов в образцах, которые могут содержать многочисленные матрицы или интерферирующие соединения.

Процесс калибровки по методу добавок:

- 1. Подготовка образцов:** Сначала готовятся несколько параллельных образцов, которые содержат неизвестное количество аналита.
- 2. Добавление стандартного раствора:** В каждый из образцов добавляют известное количество стандартного раствора аналита.
- 3. Хроматографический анализ:** Все образцы подвергаются хроматографическому анализу, который позволяет определить количество аналита в каждом образце.
- 4. Построение калибровочной кривой:** Для каждого образца строится калибровочная кривая, которая показывает зависимость между концентрацией добавленного стандартного раствора и выходным сигналом аналита.
- 5. Определение концентрации в образцах:** Путем сравнения сигнала аналита в образцах с калибровочными кривыми можно определить их концентрацию.

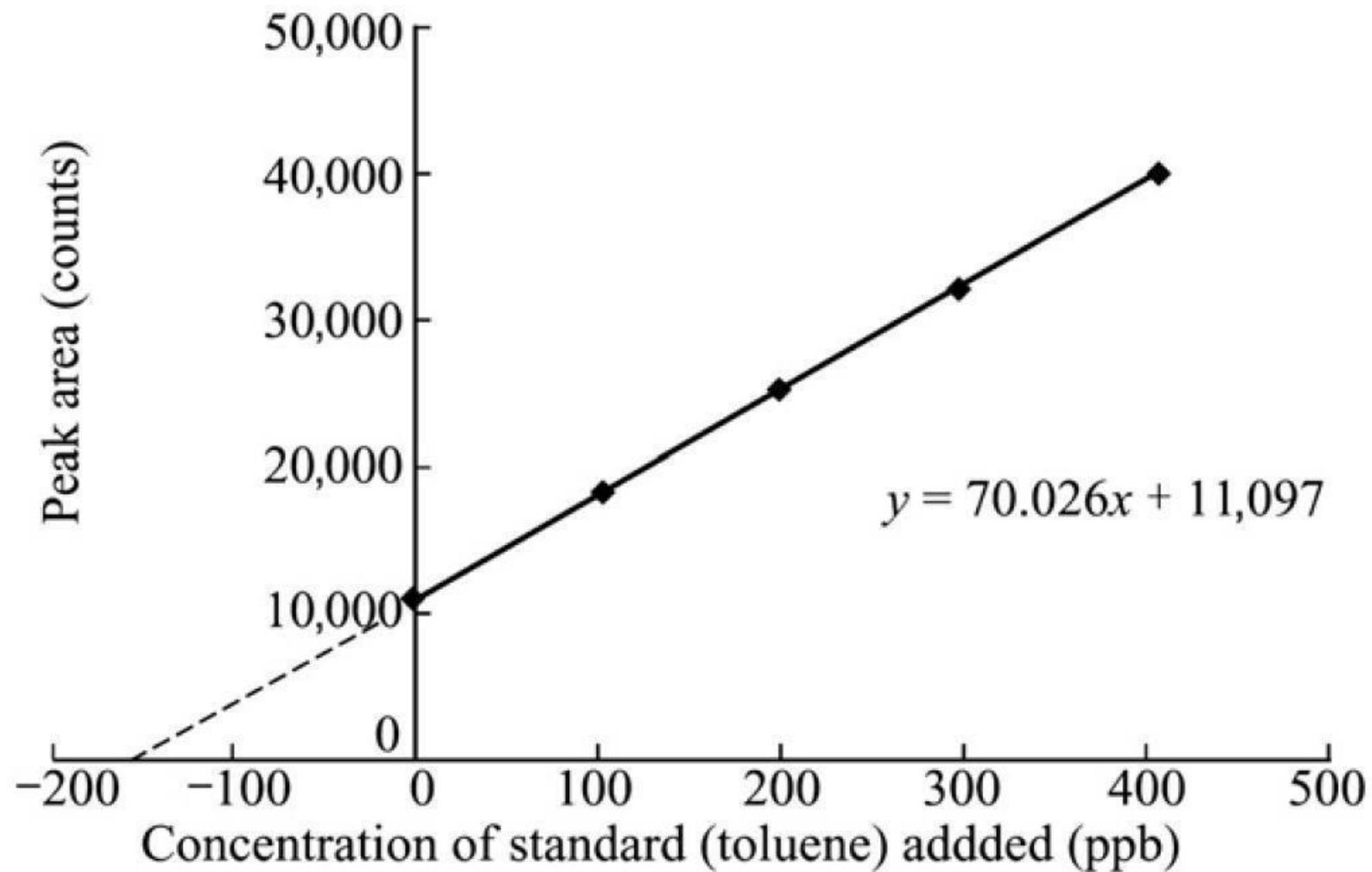
Преимущества калибровки по методу добавок включают возможность корректировки за потерями аналита в процессе подготовки образцов и уменьшение влияния матрицы образца. Однако этот метод требует тщательной калибровки и учета всех добавленных компонентов, что может быть сложно при работе с большим числом образцов.

Интерферирующие соединения в хроматографии - это вещества или компоненты, которые присутствуют в образце и могут искажать или оказывать влияние на анализ целевого соединения или аналита. Эти компоненты могут возникать из различных источников, таких как матрица образца, примеси, реакционные продукты или другие аналиты, присутствующие в образце.

Воздействие интерферирующих соединений может привести к смещению или искажению пиков хроматограммы, ухудшению разделения компонентов или даже к ошибочным результатам анализа.

Для минимизации влияния интерферирующих соединений могут использоваться различные методы, такие как предварительная очистка образцов, выбор подходящих методов экстракции, использование селективных детекторов или колонок, а также проведение калибровки с учетом этих интерференций.

Определение по методу примесей



Расчет площади пика(1)

Для всего количественного хроматографического метода необходимо рассчитать площадь пиков. Основу этих расчетов составляет нахождение площади треугольника (триангуляция). Существует несколько способов триангуляции:

- 1) Умножьте высоту пика $\frac{1}{2} h$ на его окончательную ширину μ ;
- 2) Умножьте высоту пика h на половину его окончательной ширины $\mu 0,5$;
- 3) Умножьте половину высоты треугольника (полученного путем рисования боковых линий) h' на его окончательную ширину μ ;

$\frac{1}{2} h \cdot \mu = 0,80 S_{\text{истинно}}$; $h \cdot \mu 0,5 = 0,90 S_{\text{истинно}}$; $\frac{1}{2} h' \cdot \mu = 0,97 S_{\text{истинно}}$; $h \cdot \mu 0,368 = S_{\text{истинно}}$,
здесь $S_{\text{истинно}}$ – истинное значение площади пика, полученное с использованием интегратора.

На практике $S_{\text{истинно}}$ определяется по следующей формуле:

$S_{\text{истинно}} = h \cdot \mu 0,5$ или **$S_{\text{истинно}} = h \cdot \mu 0,368$** , то есть, он находится путем умножения высоты пика на h / e , здесь e – основание натурального логарифма. В последнем случае рисовать какие-либо географические фигуры не нужно.

В аналитической практике используются три метода оценки хроматограмм:

- 1) Абсолютная калибровка (метод внешнего стандарта);
- 2) Метод нормализации;
- 3) Метод внутреннего стандарта.

Расчет площади пика(2)

Метод абсолютной калибровки определяет количество компонентов в пробе по калибровочному графику - соотношению между площадью пика (S_i) или высотой пика (h_i) измеряемого количеством вещества (C_i).

При прямолинейной зависимости $h_i(S_i) = f(c_i)$ угловой коэффициент k_i (Калибровой множитель) и количество i -го компонента в пробе определяют по формуле:

$$C_i = \frac{k_i \cdot h_i}{g} \cdot 100 = \frac{k_i \cdot S_i}{g} \cdot 100 ,$$

Расчет площади пика (3)

В этом случае к выполнению эксперимента предъявляются следующие требования:

1. точность и повторность измерения чистой пробы и определяемого вещества;
 2. строгое соблюдение режима работы колонки при калибровке. Метод абсолютной калибровки используется, когда все компоненты смеси не совпадают, обнаруживается только один или два.
- Метод нормирования основан на получении суммы площадей пиков на хроматограмме с учетом поправочного коэффициента, который составляет 100%, причем каждый отдельный пик занимает определенную часть их суммы. Предварительно детектирование пиков приводит к той же шкале чувствительности. При расчете используется следующая формула:

$$C_i = \frac{f_i \cdot h_i}{\sum f_i \cdot h_i} \cdot 100 = \frac{f_i \cdot S_i}{\sum f_i \cdot S_i} \cdot 100 ,$$

- здесь f_i – нормируемый множитель.
- Метод нормирования не требует точного количества вводимой пробы, но необходимо знать характер всех компонентов смеси.

Расчет площади пика (4)

Метод внутреннего стандарта (эталонный) заключается в добавлении в определенное количество определяемого вещества установленную дозу внутреннего стандарта и хроматографирует готовую смесь.

Концентрация компонентов в определяемой смеси C_i (% , масс. или об.) определяют по формуле.

$$C_i = \frac{f_i \cdot h_i \cdot g_{см}}{h_{см} \cdot g_{СМ}} \cdot 100 = \frac{f_i \cdot S_i \cdot g_{см}}{S_{см} \cdot g_{СМ}} \cdot 100 ,$$

где $g_{см}$, $g_{СМ}$ - стандартное вещество и количество определяемой смеси, полученной для анализа (г, моль, см³).



ВОПРОСЫ ???