

## Теория хроматографического разделения

При хроматографировании одновременно происходит разделение веществ и размывание хроматографических пиков разделяемых веществ, приводящее к ухудшению разделения. Рассмотрим теоретические подходы, объясняющие эти два противоположных процесса хроматографии.

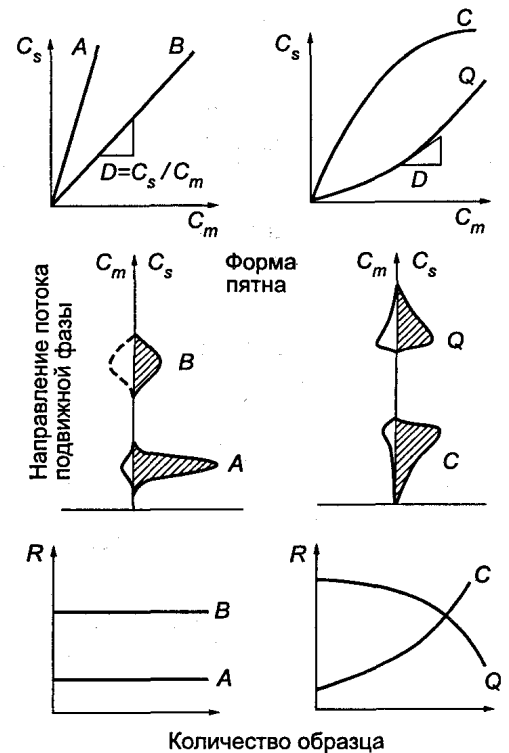
Хроматографическое разделение определяется различной сорбцией компонентов смеси, что связано с природой сорбента и разделяемых веществ. Фундаментальной величиной, характеризующей относительное сродство вещества к подвижной и неподвижной фазам, является коэффициент распределения ( $D$ ).  $D = c_s/c_m$ . - отношение равновесных концентраций вещества в неподвижной ( $c_s$ ) и подвижной ( $c_m$ ) фазах (при постоянной температуре). Исправленный удерживаемый объем связан с  $D$  простым соотношением  $V_R' = D V_s$ .

Теоретический подход, объясняющий размывание, основан на изучении форм изотерм сорбции – графической зависимости количества вещества в неподвижной фазе ( $c_s$ ) от его концентрации в подвижной фазе ( $c_m$ ) при постоянной температуре. Изотерма может быть линейной, выпуклой и вогнутой. Угол наклона определяется коэффициентом распределения  $D = dc_s/dc_m$ .

Если изотерма линейна ( $D = \text{const}$ ), зона симметрична. Концентрация вещества

максимальна в центре зоны и симметрично убывает к краям. Такие пики характерны для линейной хроматографии. Это идеальный случай. На практике такие пики получаются при малых количествах веществ, вводимых в колонку.

Выпуклый характер изотермы свидетельствует о том, что значение  $D$  для больших концентраций вещества меньше, чем для малых, следовательно, часть зоны с большей концентрацией перемещается быстрее, чем часть зоны с малой



концентрацией. В результате задняя граница хроматограммы (тыл) размывается. При вогнутой хроматограмме размытым оказывается фронт зоны. На практике стараются работать в области линейной изотермы, т.е. использовать малые концентрации. Однако в процессе хроматографического разделения часто происходит размывание пиков. Для объяснения этого явления обычно используют теорию теоретических тарелок и кинетическую теорию.

**1. Теория теоретических тарелок.** Теория теоретических тарелок, общая для всех многостадийных процессов основана на некоторых допущениях:

- 1) колонка состоит из определенного числа теоретических тарелок;
- 2) равновесие на каждой тарелке считается достигнутым до того, как подвижная фаза переместится на следующую тарелку, т. е. равновесие устанавливается мгновенно;
- 3) на любой тарелке в любой момент времени число молекул (ионов) сорбируемых компонентов пробы значительно меньше, чем число сорбируемых молекул элюента, т. е. вводимая проба должна быть малой, а изотерма - линейной;
- 4) все протекающие в колонке процессы рассматриваются как взаимно независимые.

**Теоретическая тарелка** - это гипотетическая зона, высота которой соответствует достижению равновесия между двумя фазами. Чем больше теоретических тарелок в колонке, т. е. чем большее число раз устанавливается равновесие, тем эффективнее колонка.

**Эффективность колонки** - это характеристика качества колонки, определяемая числом теоретических тарелок ( $N$ ) и высотой теоретической тарелки ( $H$ ). Так как хроматографический процесс непрерывен и не равновесен, то представление о теоретической тарелке в хроматографии имеет умозрительный, формальный характер. Эта теория позволяет описать движение зоны с максимальной концентрацией компонента, экспериментально оценить ширину полосы (степень размывания хроматографической полосы) и эффективность колонки. Она дает математическую модель продвижения

полосы компонента через колонку, из которой следует, что элюированная полоса имеет форму и ширину нормального распределения Гаусса:  $c/c_{\max} = e^{-(\beta - N)^2 / 2N}$ , где  $c_{\max}$  - концентрация в максимуме кривой;  $\beta$  - относительный объем прошедшей через колонку подвижной фазы, соответствующий появлению концентрации  $c$ ;  $N$  - число теоретических тарелок.

Гауссов характер хроматограммы связан с беспорядочным движением огромного числа частиц растворенного вещества в хроматографической колонке. Одни частицы перемещаются быстрее вниз по колонке, другие - медленнее. Следствием этих случайных процессов является симметричный разброс значений скорости перемещения вокруг среднего значения, характеризующего поведение усредненной молекулы. *Ширина полосы пропорциональна времени пребывания подвижной фазы в колонке и обратно пропорциональна скорости ее передвижения.*

Поскольку ширина гауссовой кривой определяется стандартным отклонением  $\sigma$ , ширина пика  $w$  у основания треугольника равна  $4\sigma$  (в интервале  $\pm 2\sigma$  от максимума площадь треугольника составляет  $\sim 96\%$  от площади, лежащей под кривой). Следовательно, полученная по хроматограмме величина  $\sigma$  служит количественной мерой размывания зоны. Величину  $\sigma$  можно оценить, проведя касательные к тылу и фронту хроматограммы до пересечения с нулевой (базовой) линией. Ясно, что чем меньше размывание и чем уже хроматографический пик, тем больше пиков разделяемых веществ может быть размещено на хроматограмме за одно и то же время.

Количественной мерой эффективности хроматографической колонки служат высота  $H$ , эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ), и число теоретических тарелок  $N$ . Число теоретических тарелок легко рассчитать непосредственно из хроматограммы, сравнивая ширину пика  $w$  и время пребывания  $t_R$  компонента в колонке ( $t_m + t_s = t_R$ ):  $N = 16 (t_R / w)^2 = (t_R / \sigma)^2$ , определив  $N$  и зная длину колонки, легко вычислить  $H$ :  $H = L / N$ , где  $L$  — длина колонки, см.

В случае высокоэффективной колонки размывание полос небольшое, пики узкие, величина  $H$  составляет 0.3 - 1 мм. В идеальном случае  $H$  приближается к диаметру  $d_p$  зерна сорбента. Чтобы сравнить эффективность двух колонок, следует использовать приведенную высоту тарелки:  $h = H / d_p$

Теория ТТ дает возможность сравнить эффективность различных колонок, оценить качество сорбента и заполнения колонки. Однако эта теория не позволяет выявить зависимость  $N$  и  $H$  от скорости подвижной фазы, природы и зернения сорбента, не может дать практических рекомендаций, позволяющих избежать размывания хроматографических пиков.

**2. Кинетическая теория хроматографии.** Кинетическая теория хроматографии предложена датскими химиками Ван-Деемтером и Клинкенбергом. Согласно этой теории, размывание хроматографических пиков обусловлено, главным образом, тремя независимыми процессами, вклад каждого из которых может быть оценен с помощью *уравнения Ван-Деемтера*:

$$H = A + B/v + Cv,$$

где  $A$ ,  $B/v$ ,  $Cv$  - члены, учитывающие неравномерность движения потока подвижной фазы (вихревая диффузия), молекулярную диффузию и отклонение от сорбционного равновесия (сопротивление массопереносу), соответственно;  $A$ ,  $B$ ,  $C$  – константы,  $v$  - линейная скорость потока.

**Вихревая диффузия**  $A$  зависит от структуры сорбента и изменяется по длине колонки. Полости между частицами наполнителя, через которые протекает подвижная фаза, имеют форму капилляров, в которых у стенок и в центре скорость потока различна. Размеры частиц неодинаковы, поэтому различна длина капилляров и соответственно скорость перемещения подвижной фазы по этим капиллярам. Вихревая диффузия - следствие изменения линейной скорости потока подвижной фазы по сравнению с ее средним значением. Размывание зоны за счет неравномерного потока подвижной фазы описывают уравнением:

$A = 2 \lambda d_p$ , где  $\lambda$  - коэффициент гомогенности упаковки колонки;  $d_p$  - диаметр частиц сорбента. Обычно величина  $\lambda$  изменяется от 0,1 до 0,8. Плохая упаковка

и каналообразование приводят к уширению полосы за счет вихревой диффузии. Для уменьшения размывания полосы нужно равномерно заполнять колонку мелкими и по возможности однородными по дисперсности частицами. Из рис. видно, что вклад вихревой диффузии в  $H$  не зависит от скорости потока  $v$ .

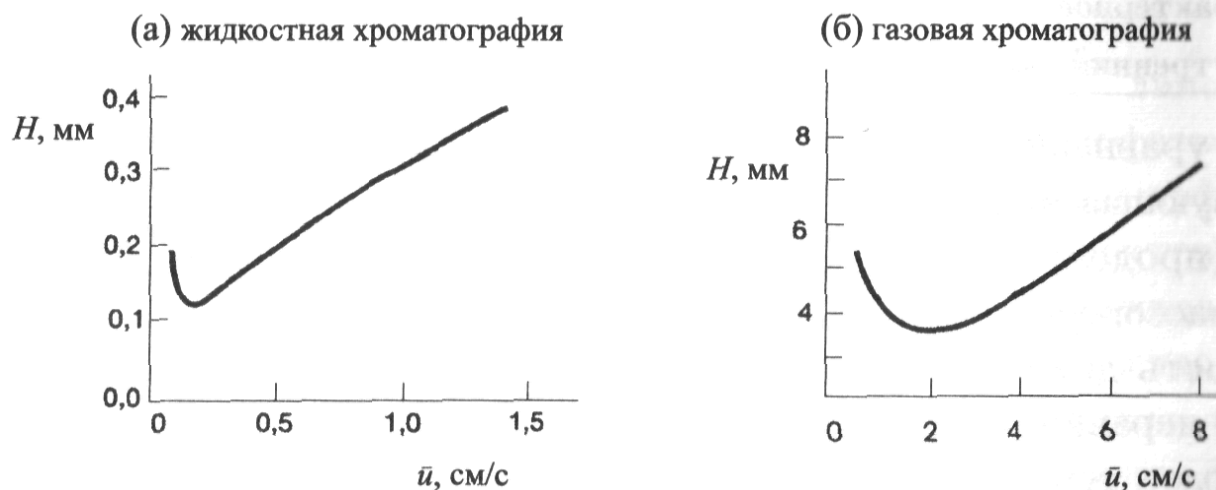
**Молекулярная (продольная) диффузия  $V/v$ .** Размывание полосы за счет молекулярной диффузии обусловлено миграцией молекул в подвижной фазе из участков с большей концентрацией в направлении, где концентрация меньше, и описывается уравнением:  $V = 2 \gamma D_m$

где  $\gamma$  - коэффициент, учитывающий ограничение диффузии наполнителем колонки, его величина меньше 1;  $D_m$  - коэффициент диффузии хроматографируемого вещества в подвижной фазе.

Эффективность колонки возрастает ( $H$  уменьшается) при заполнении колонки мелкими и близкими по размерам частицами, при использовании подвижных фаз, в которых коэффициенты диффузии низки, при высокой линейной скорости потока. Поскольку жидкая подвижная фаза обладает большей плотностью и вязкостью, чем газообразная, коэффициент диффузии в жидкости значительно (на 3 - 4 порядка) ниже, чем в газе. Графическая зависимость эффективности  $H$  от линейной скорости потока будет такой, как показано на рис. (б).

**Сопротивление массопереносу  $S_v$ .** Член  $S_v$  в уравнении Ван-Деемтера учитывает размывание пика за счет сопротивления массопереносу при непрерывном переходе вещества из подвижной фазы в неподвижную и обратно. Таким образом, величина  $S_v$  характеризует скорость распределения вещества между двумя фазами.

### **Зависимость ВЭТТ от линейной скорости потока:**



Эффективность хроматографической колонки имеет сложную зависимость от скорости потока подвижной фазы и выражается гиперболой, минимум которой соответствует оптимальному значению  $v$ . Задача экспериментатора - найти оптимальную скорость потока.  $H_{\text{opt}} = A + 2\sqrt{BC}$  Из этого следует, что для повышения эффективности колонки необходимо:

- уменьшение размера частиц и толщины слоя иммобилизованной жидкой неподвижной фазы;
- увеличение однородности размеров частиц неподвижной фазы и упаковки колонки;
- уменьшение внутреннего диаметра колонок;
- использование неподвижных фаз с высокими коэффициентами диффузии и подвижных фаз с низкими коэффициентами диффузии. В газовой хроматографии коэффициенты диффузии в подвижной (газовой) фазе существенно уменьшаются с уменьшением температуры.

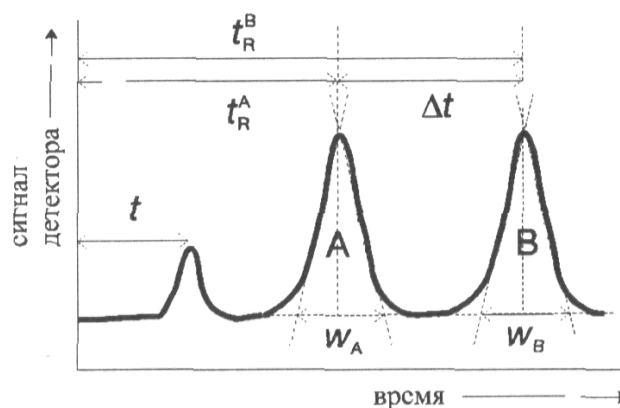
Таким образом, *кинетическая теория дает основу для оптимизации хроматографического процесса.*

**3. Селективность и разрешение.** Для решения вопроса о возможности хроматографического разделения смеси на индивидуальные вещества нужно сопоставить их хроматографические параметры. Для этого используют коэффициент селективности -  $\alpha$  и фактор разрешения -  $R_s$ .

Коэффициент селективности является мерой относительного удерживания или подвижности разделяемых веществ:

$$\alpha = t'_{RB} / t'_{RA} = V'_{RB} / V'_{RA} = D_B / D_A = k'_B / k'_A$$

Коэффициент селективности – это термодинамическая характеристика, зависящая при постоянной температуре только от природы разделяемых соединений и свойств подвижной и неподвижной фаз. При  $\alpha = 1$  разделение в данных условиях невозможно. Величину  $k'$  можно изменять, варьируя  $D$ ,  $V_s$ , а также  $V_m$ .



Величина коэффициента селективности характеризует только взаимное расположение двух хроматографических пиков (точнее, их максимумов). В то же время степень разделения зависит также от величины размывания пиков, т.е. эффективности колонки.

Обобщающим параметром, характеризующим степень разделения веществ с учетом как селективности, так и эффективности хроматографического процесса, служит *фактор разрешения* (сокращенно называемый просто «разрешением»)  $R_s$ . Для пиков двух веществ А и В он вычисляется как

$R_s = 2 (t_{RB} - t_{RA}) / w_A + w_B$ , т.е. разрешение пиков зависит от их ширины и от расстояния между максимумами пиков. Разрешение пиков  $R_s$  может быть рассчитано из данных, приведенных на хроматограмме. Формулу можно представить и в другом виде, с использованием величин коэффициентов емкости, коэффициента селективности и числа теоретических тарелок.

$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} (\alpha - 1/\alpha) \cdot (k'/1+k')$ , т.е. разрешение – функция эффективности  $N$ , коэффициента селективности  $\alpha$  и емкости  $k'$  колонки.

Для пиков одинаковой высоты и симметричной формы достаточным обычно считается разрешение  $R_s = 1$ . Легко видеть, что для полного разделения пиков в случае, если они несимметричны или сильно различаются по высоте, требуется большее разрешение.

На рис. показано влияние эффективности колонки и селективности сорбента на разделение смеси двух веществ. Оптимизация разделения сводится к выбору лучшего сочетания параметров, входящих в уравнение.

а - высокая селективность, но плохая

эффективность;

б - высокая эффективность, но плохая

селективность;

в - высокая эффективность, достаточная

селективность.

