

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского

Национальный исследовательский университет

**Учебно-научный и инновационный комплекс
"Новые многофункциональные материалы и нанотехнологии"**

Мосягин П.В., Крылов В.А.

**ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ
ТОКСИКАНТОВ В ВОДЕ**

Электронное учебно-методическое пособие
Мероприятие 1.2. Совершенствование образовательных технологий, укрепление
материально-технической базы учебного процесса

Учебная дисциплина: «Аналитическая химия»

Направление подготовки 020100 «Химия», специальности 020101 «Химия»,
240306 «Химическая
технология монокристаллов, материалов и изделий электронной техники»,
031003.65 «Судебная экспертиза»

Нижний Новгород
2012

УДК 543.544
ББК Г43/48

ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ
ТОКСИКАНТОВ В ВОДЕ. Мосягин П.В., Крылов В.А.
Электронное учебно-методическое пособие. – Нижний Новгород: Нижегородский
государственный университет, 2012. – 64 с.

Электронное учебно-методическое пособие предназначено для студентов ННГУ, обучающихся по направлению подготовки 020100 «Химия» и специальностям 020101 «Химия», 240306 «Химическая технология монокристаллов, материалов и изделий электронной техники», 031003.65 «Судебная экспертиза».

В учебно-методическом пособии рассмотрены различные варианты проведения экстракционного извлечения примесей при проведении анализа воды. Приведены теоретические основы жидкостно-жидкостной экстракции. Особое внимание в пособии уделено жидкофазному микроэкстракционному концентрированию. В пособии даны теоретические основы важного современного аналитического метода – газовой хроматографии с пламенно-ионизационным и масс-спектрометрическим детектированием.

В пособии содержатся описания лабораторных работ по хромато-масс-спектрометрическому и газохроматографическому анализу воды с использованием жидкофазной экстракции.

© Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского,
2012

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
1. Теоретическая часть	5
1.1. Теоретические основы экстракции	5
1.2. Теоретические основы хроматографии	15
1.3. Детектирование в газовой хроматографии	30
1.4. Пламенно-ионизационный детектор	31
1.5. Масс-спектрометрический детектор	33
2. Практическая часть	41
Лабораторная работа № 1 (для общего практикума). Газохроматографическая идентификация ароматических углеводородов в растворе четыреххлористого углерода	41
Лабораторная работа № 2 (для общего практикума). Газохроматографическое определение концентрации ароматических углеводородов в растворе четыреххлористого углерода	45
Лабораторная работа № 3 (для общего практикума). Определение содержания ароматических углеводородов в воде с помощью жидкостной экстракции	46
Лабораторная работа № 4 (для спецпрактикума). Хромато-масс-спектрометрическая идентификация галогенсодержащих и ароматических примесей в растворе четырёххлористого углерода	48
Лабораторная работа № 5 (для спецпрактикума). Хромато-масс-спектрометрическое определение концентрации галогенсодержащих и ароматических примесей в растворе четырёххлористого углерода	58
Лабораторная работа № 6 (для спецпрактикума). Анализ воды с помощью жидкофазного микроэкстракционного концентрирования с диспергированием экстрагента	61
Список литературы	63

Введение

Присутствие в воде органических токсикантов приводит к онкологическим, мутагенным, тератогенным и общетоксическим последствиям в человеческом организме. Особенную актуальность эта проблема приобретает в условиях возрастающего общего загрязнения окружающей среды. Поэтому контроль содержания токсикантов в воде является важной эколого-аналитической задачей.

Определение большинства органических токсикантов на уровне ПДК и менее невозможно без использования современных аналитических методов. Важное место среди них занимает газовая хроматография с разделением примесей на капиллярных колонках. В практике эколого-аналитического контроля в качестве систем регистрации сигнала применяются современные высокочувствительные детекторы: пламенно-ионизационный, электронно-захватный, фото-ионизационный, масс-спектрометрический. Применение данных детекторов позволяет реализовывать пределы обнаружения примесей на уровне 10^{-4} - 10^{-8} масс. %.

Анализ непосредственно воды при использовании газовой хроматографии невозможен, т.к. большое количество воды может привести к поломке детектора и порче капиллярной колонки. Поэтому необходима предварительная пробоподготовка образца воды. Наиболее распространенным методом подготовки таких образцов является *экстракция* примесей из воды. Экстракция может быть не только способом *извлечения* токсикантов из анализируемой матрицы, но и методом *концентрирования* примесей.

1. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

1.1. Теоретические основы экстракции

Экстракция (с лат. *extractio* - извлечение) представляет собой процесс распределения вещества между двумя несмешивающимися жидкими фазами (*жидкофазная экстракция*) или между жидкостью и твердым сорбентом (*твердофазная экстракция*). Экстракция также используется для извлечения примесей из газов. Настоящее учебное пособие посвящено вопросам экстракции примесей из воды. По агрегатному состоянию вещества, посредством которого извлекают примеси из матрицы, экстракцию классифицируют на *твердофазную* (ТФЭ) и *жидкостно-жидкостную* (ЖЖЭ). По количеству используемого для извлечения примесей сорбента/экстрагента экстракционные методы подразделяют на традиционную экстракцию (макроэкстракцию) и *микроэкстракцию*.

Твердофазная экстракция (solid-phase extraction – SPE).

Твердофазная экстракция основана на равновесном распределении примесей между водной фазой и твердым поглотителем (сорбентом). Сорбент, концентрирующий вещества на своей поверхности, называется *адсорбентом*. Сорбент, растворяющий в своем объеме компоненты жидких смесей, называется *абсорбентом*. Вещество, удерживаемое сорбентом, называется *сорбатом*.

Для извлечения и концентрирования органических веществ используют следующие группы сорбентов:

- активированный уголь и различные модифицированные материалы на основе углерода (Карбоксен, Карбовакс, углеродные нанотрубки);
- неорганические сорбенты (силикагель, оксид алюминия и др.);
- силикагели на основе полимерных материалов (полидиметилсилоксана, полистирола и др.).

Энергия взаимодействия сорбента с аналитом достаточно велика, что позволяет эффективно извлекать примеси из воды. Однако это явление одновременно является и негативным фактором, т.к. затрудняет десорбцию (удаление) примесей с сорбента. Особенно остра эта проблема при извлечении веществ с высоким молекулярным весом. Неполная десорбция приводит к следующим негативным последствиям:

1. Занижение результатов анализа.
2. Завышение результатов анализа. В этом случае сигнал примеси предыдущего анализа суммируется с сигналом от примесей текущего анализа (эффект «памяти» сорбента).

Используют два типа десорбции:

1. Термодесорбция. Этот подход основан на быстром нагреве патрона с сорбентом в потоке чистого инертного газа. Примеси, удаленные таким образом с

сорбента, поступают с потоком газа в систему дозирования хроматографа. Такой способ десорбции используют для определения относительно летучих и термостабильных веществ.

2. Использование растворителей. В этом случае используют кипячение патрона с сорбентом в *аппарате Сокслета*. Существенным недостатком такого подхода является длительность десорбции, которая может составлять нескольких часов, а в ряде случаев и нескольких суток. Столь длительное кипячение может не только увеличивает время анализа, но и может приводить к разрушению аналита.

В последнее время получила развитие десорбция растворителем под действием *ультразвука и микроволнового излучения.*

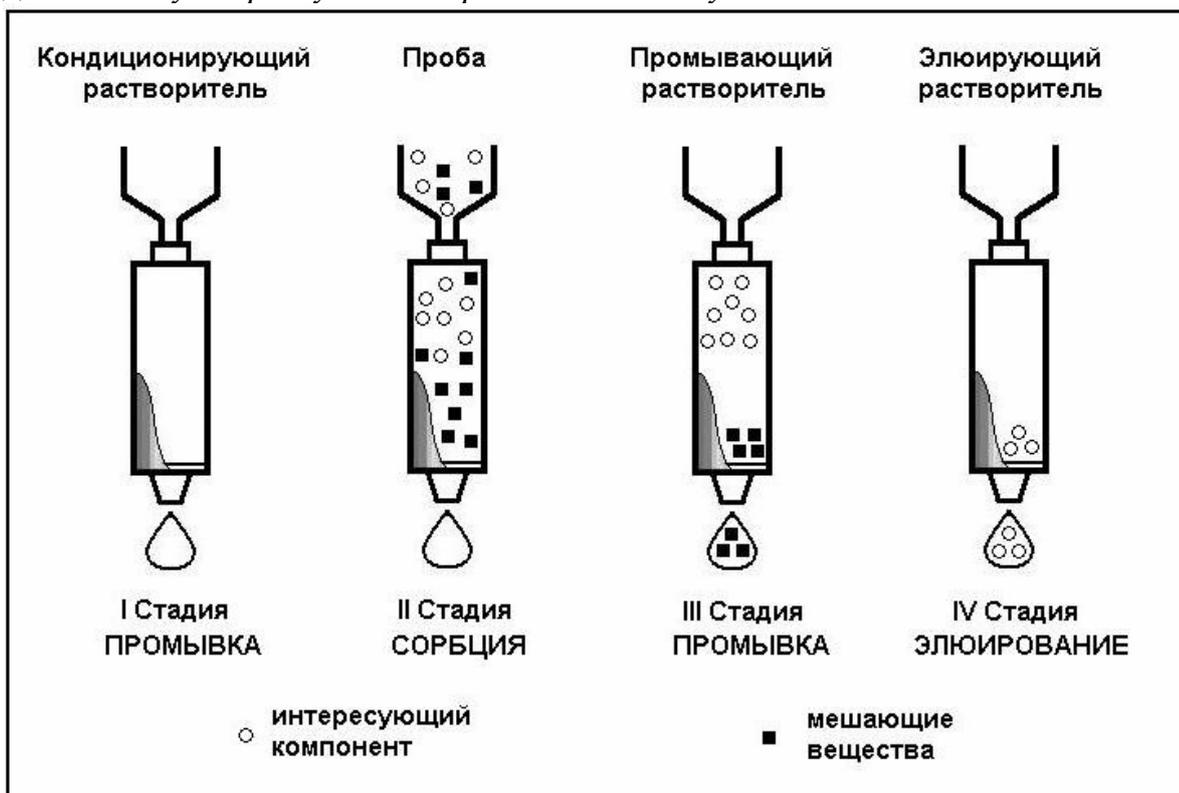


Рис. 1. Принципиальная схема проведения твердофазной экстракции с десорбцией растворителем.

Микротвердофазная экстракция (solid phase micro-extraction – SPME).

Использование микроколичеств сорбента привело к созданию *микротвердофазной экстракции* (МТФЭ). Как правило, МТФЭ осуществляется с помощью *фибера*, заполненного сорбентом. Диаметр фибера – от 1–2 мм до нескольких микрон, длина – от нескольких сантиметров до нескольких миллиметров. Стадию десорбции совмещают со стадией дозирования, т.к. десорбция примесей происходит непосредственно в испарителе газового хроматографа. Для удобства проведения пробоподготовки иногда фибер с сорбентом помещают в игле шприца для дозирования пробы. Существенными

недостатками МТФЭ являются неполная десорбция и дороговизна ее осуществления, т.к. используемые фиберы, как правило, являются одноразовыми.

Неполная десорбция, влияние фона сорбента, сложность и дороговизна инструментального оформления ограничивают применение твердофазной экстракции. Более привлекательной для проведения пробоподготовки образцов воды является *жидкофазная экстракция*.

Жидкостно-жидкостная экстракция (liquid-liquid extraction – LLE).

Жидкостно-жидкостная экстракция (ЖЖЭ) является одним из методов концентрирования примесей и широко применяется в аналитической практике. ЖЖЭ позволяет проводить относительное и абсолютное концентрирование примесей самой различной природы. Метод ЖЖЭ рекомендован для определения токсикантов в воде Американским агентством по защите окружающей среды (United States Environmental Protection Agency – US EPA). Жидкофазная экстракция является основой большинства методик, рекомендованных государственными стандартами РФ для анализа вод различного происхождения.

Экстракция представляет собой распределение, т.е. одновременное и взаимосвязанное растворение вещества в двух соприкасающихся жидких фазах. Растворение и экстракция – это процессы, в которых наиболее заметно проявляется взаимодействие межмолекулярных сил. Межфазное равновесие достигается в результате влияния ряда факторов, действующих между молекулами экстрагируемого вещества и экстрагента.

Одним из таких факторов является взаимодействие за счет Ван-дер-Ваальсовых сил, наблюдаемых между незаряженными молекулами (физический механизм экстракции). Различают три слагаемых этого взаимодействия:

- ориентационное (диполь-дипольное) взаимодействие, возникающее при наличии у несимметричных молекул постоянного диполя;
- индукционное взаимодействие, проявляемое в тех случаях, когда постоянный диполь молекулы создает в соседней неполярной молекуле индуцированный диполь;
- дисперсионное взаимодействие, происходящее между неполярными молекулами.

Силы Ван-дер-Ваальса всегда характеризуются как слабые (0.5–1 кДж/моль). Они универсальны, проявляются во всех реальных системах и не имеют направленности. Экстракция только за счет сил Ван-дер-Ваальса наблюдается при извлечении алифатических соединений алифатическими углеводородами.

Вторым видом взаимодействия является сольватация одной или несколькими молекулами экстрагента с образованием сольвата определенного состава (специфическая сольватация). Сольватация происходит вследствие донорно-акцепторного взаимодействия (образование π -комплексов) или под влиянием межмолекулярных водородных связей.

Третьей причиной экстракции может быть химическое взаимодействие растворенного соединения с экстрагентом или со специально введенными реагентами, приводящее к образованию экстрагируемых соединений. Сюда относится экстракция веществ в виде солей, ионных ассоциатов, внутрикомплексных соединений.

Силы, действующие между молекулами экстрагируемого вещества и экстрагента, по влиянию на константы распределения можно расположить в следующий ряд:

Водородные связи > связи в π-комплексах > силы Ван-дер-Ваальса

Распределение веществ (A – концентрация вещества) в условиях равновесия в системе, состоящей из двух ограниченно смешивающихся жидких фаз можно представить в виде:



Рис. 2. Схематическое изображение процесса ЖЖЭ

Изменение энергии Гиббса для гетерогенного равновесия описывается уравнением вида:

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{(a_A)_{(o)}}{(a_A)_{(e)}} \quad (1)$$

где a_A – активность вещества A .

Поскольку в условиях равновесия $\Delta G = 0$, то:

$$\frac{(a)_{(o)}}{(a)_{(e)}} = e^{-\Delta G^0/RT} = K_D^0 \quad (2)$$

Величину K_D^0 называют константой распределения. Когда коэффициенты активности исследуемых веществ равны единице в водной и органической фазах, то концентрации веществ (A) равны их активностям (a_A).

Обычно экстракционные процессы характеризуются коэффициентом распределения, который является отношением равновесных концентраций вещества в органической фазе к концентрации его в водной фазе.

$$D = \frac{C_o}{C_B} \quad (3)$$

Коэффициент распределения приблизительно равен отношению растворимостей экстрагируемого вещества в отдельных фазах. Необходимо учитывать тот факт, что при экстракции обе фазы взаимно насыщаются друг другом. Тогда при распределении вещества A между двумя растворителями:

$$D \approx \frac{S_o}{S_B} \quad (4)$$

где S_o – растворимость вещества А в органическом растворителе, насыщенном водой;

S_B – растворимость вещества А при той же температуре в воде, насыщенной той же органическим растворителем.

Выражение (4) можно использовать для приближенных расчетов в случае, если достаточно велика разница в растворимости вещества А в органической фазе и воде.

При проведении ЖЖЭ объем используемого экстрагента составляет от нескольких сотен микролитров до нескольких десятков миллилитров. Использование столь больших объемов дорогостоящих растворителей является существенным недостатком традиционной экстракции. Из полученного количества экстракта (несколько мл) только небольшая доля (несколько мкл) поступает в аналитический прибор (хроматограф). Таким образом, существует серьезная проблема утилизация экстрагентов, многие из которых являются токсичными веществами (такие как четыреххлористый углерод, хлороформ, хлорбензол и др.).

Существенный недостаток традиционной ЖЖЭ – слабое концентрирование примесей из водной фазы в органическую. Отсутствие эффективного концентрирования снижает предельные возможности аналитической методики и делает невозможным определение ряда токсикантов на уровне ПДК и менее.

Решение описанных выше проблем возможно с использованием *жидкофазной микроэкстракции*.

Жидкостно-жидкостная микроэкстракция (micro liquid–liquid extraction – MLLE)

В основе жидкофазной микроэкстракции (ЖФМЭ) лежит использование малых количеств экстрагента (несколько мкл). При этом соотношение объемов водной и органической фаз находится на уровне 10^2 - 10^3 .

Использование жидкофазной микроэкстракции позволяет проводить эффективное концентрирование примесей, характеристикой которого является *коэффициент концентрирования*:

$$K_{кон} = \frac{C_e}{C_B} \quad (5)$$

где C_e – концентрация примеси в экстракте;

C_B – концентрация примеси в анализируемой воде.

Коэффициент концентрирования связан с равновесным коэффициентом распределения и объемами фаз следующим выражением:

$$\frac{1}{K_{кон}} = \frac{1}{D} + \frac{V_e}{V_B} \quad (6)$$

где D – равновесный коэффициент распределения;
 V_o – объем органической фазы;
 V_b – объем водной фазы.

Как следует из выражения, при увеличении соотношения объема водной фазы к объему органической фазы, коэффициент концентрирования приближается к равновесному коэффициенту распределения. Благодаря этому при использовании ЖФМЭ удастся достигать коэффициентов концентрирования на уровне 10^2 – 10^3 .

Физико-химические основы жидкофазной микроэкстракции

При осуществлении процесса микроэкстракции происходит распределение анализируемого вещества между двумя несмешивающимися жидкими фазами (водной и органической). Массопередача анализируемого вещества от водной фазы (образца) к органической фазе (экстрагенту) продолжается до достижения термодинамического равновесия. Равновесие может быть достигнуто быстрее при перемешивании водной фазы, содержащей анализируемое вещество. В соответствии с материальным балансом количество анализируемого вещества в органической и водной фазах должно быть равно начальному количеству в образце, а именно:

$$C_b \cdot V_b + C_o \cdot V_o = C_{b,0} \cdot V_b \quad (7)$$

где C_b и C_o - концентрация анализируемых веществ в водном образце и экстракте, соответственно; V_b – объем водного образца и V_o – объем экстракта; $C_{b,0}$ – начальная концентрация анализируемого вещества в водном образце.

Динамический массовый баланс анализируемых веществ в капле можно представить в следующем виде:

$$\frac{d(C_o V_o)}{dt} = k_{общ} \cdot A_i \cdot (D \cdot C_b - C_o) \quad (8)$$

где A_i – поверхность массообмена; D – коэффициент распределения и $k_{общ}$ – общий коэффициент массопередачи анализируемого вещества фазы. Коэффициент массопередачи можно представить следующим выражением:

$$\frac{1}{k_{общ}} = \frac{1}{k_o} + \frac{D}{k_b} \quad (9)$$

где k_o и k_b - коэффициент массопередачи анализируемого вещества в органической и водной фазах, соответственно. В первом приближении, если мы принимаем, что объем V_o и дисперсность экстрагента остаются постоянными, тогда A_i также постоянно. Из уравнения (7) и (8) может быть получено следующее выражение:

$$C_o = C_o^{равн} \cdot (1 - e^{-\lambda t}) \quad (10)$$

где $C_o^{равн}$ – концентрация анализируемого вещества в экстракте в состоянии равновесия и λ – константа скорости. $C_o^{равн}$ и λ можно представить следующими выражениями:

$$C_o^{равн} = D \cdot C_{\epsilon,0} \cdot \frac{V_{\epsilon}}{V_{\epsilon} + D V_o} \quad (11)$$

$$\lambda = \frac{k_{общ} \cdot A_i}{V_o} \cdot \left(1 + \frac{D V_o}{V_{\epsilon}}\right) \quad (12)$$

Выражение (8) представляет собой уравнение скорости экстракции. Из выражения (12) видно, что при уменьшении объема органической фазы V_o скорость экстракции λ увеличивается.

Органический растворитель, первоначально представленный отдельной фазой, распределяется между двумя фазами. Следовательно, мы имеем следующее выражение:

$$C_{\epsilon}^{раств} \cdot V_{\epsilon} + \rho_o \cdot V_o = \rho_o \cdot V_{o,0} \quad (13)$$

где, ρ_s – плотность экстрагента; $C_B^{раств}$ – концентрация растворителя в водной фазе и $V_{o,0}$ – первоначальный объем экстрагента.

Динамический массовый баланс таким образом можно представить следующим образом:

$$\rho \frac{d V_o}{dt} = -V_{\epsilon} \frac{d C_{\epsilon}^{раств}}{dt} = -k_{раств} \cdot A_i \cdot (C_{насыщ} - C_{\epsilon}^{раств}) \quad (14)$$

где, $k_{раств}$ – коэффициент массопередачи растворителя в пленке водной фазы и $C_{насыщ}$ – равновесная концентрация органического растворителя в водной фазе (т.е. растворимость растворителя в воде). Коэффициент $k_{раств}$ может быть получен из независимых экспериментов без присутствия анализируемого вещества. Используя формулы (8) и (14) было получено следующее выражение:

$$\frac{d C_o}{dt} = \frac{k_{общ} \cdot A_i}{V_o} \cdot (D C_{\epsilon} - C_o) + \frac{k_{раств} \cdot A_i \cdot C_o}{V_o \rho} \cdot (C_{насыщ} - C_{\epsilon}^{раств}) \quad (15)$$

Выражение (15) представляет собой наиболее точное описание динамики микроэкстракционного концентрирования.

При проведении экстракции из паровой фазы необходимо учитывать и потери при испарении, отражаемые следующим уравнением:

$$V_{исп} = \frac{M P_{пар} V_o}{\rho R T} \quad (16)$$

где $V_{исп}$ – объем испаряющегося экстрагента, M – молекулярный вес экстрагента, T – температура проведения экстракции, R – универсальная газовая постоянная.

Классификация способов микроэкстракционного концентрирования.

В микроэкстракционном концентрировании можно выделить три основные разновидности, различающиеся методом введения экстрагента в анализируемый раствор: 1) капельную микроэкстракцию; 2) мембранную экстракцию; 3) микроэкстракцию с диспергированием растворителя.

Микроэкстракция в отдельную каплю. Впервые этот метод был предложен Джаннот и Кэнтвел в 1996 г. Он заключается в следующем (рис. 3). В микрошприц (1) отбирали определенный объем экстрагента, обычно не превышающий 1–3 мкл. Затем иглой микрошприца прокалывали прокладку виалы, помещали иглу в исследуемый раствор (2) и при помощи поршня аккуратно выдавливали в раствор экстрагент, при этом на конце иглы образовывалась капля (6). Далее включали магнитную мешалку (3) и перемешивали раствор для транспорта примесей к экстрагенту. После накопления примесей каплю затягивали в микрошприц и вводили в аналитический прибор. Важным достоинством метода является объединение стадий концентрирования примесей и дозирование пробы в одном устройстве и его органичное сочетание с хроматографическим анализом. Сложность осуществления капельного концентрирования связана с нестабильностью капли: она может «срываться» с иглы микрошприца и частично растворяться в анализируемом растворе.

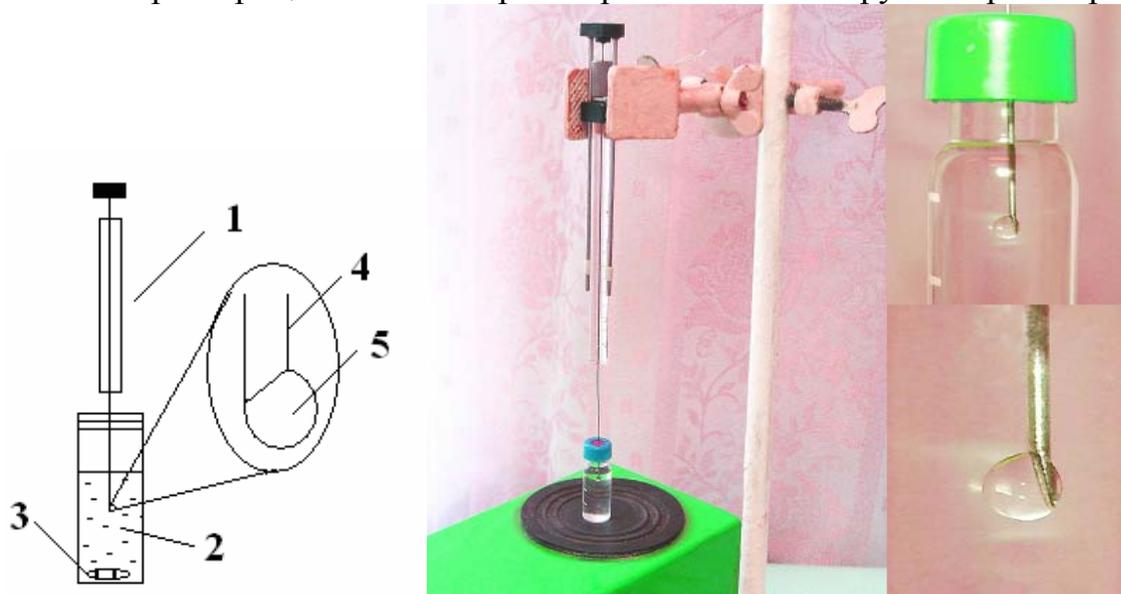


Рис. 3. Установка для концентрирование в отдельную каплю:

1 – микрошприц, 2 – исследуемый раствор, 3 – магнитная мешалка, 4 – игла микрошприца, 5 – капля экстрагента

Мембранная экстракция. Наибольшее распространение получила *двухфазная мембранная экстракция*. Разработка относится к 1999 г. Реализация данного варианта возможна двумя способами. В первом – мембрану в виде полого капилляра закрепляют на конце иглы микрошприца. Затем мембрану опускают в

исследуемый раствор и выдавливают из микрошприца необходимый объем экстрагента. Для ускорения переноса вещества включают магнитную мешалку. После достижения необходимой степени концентрирования экстракт затягивают в микрошприц, снимают капилляр мембрану и вводят экстракт в аналитический прибор. Во втором варианте использовали *U*-образную капиллярную мембрану. Введение экстрагента и отбор экстракта осуществляли разными шприцами. Это позволило частично уменьшить влияние эффекта “памяти” шприца вследствие анализа предыдущих проб. Основным материалом, из которого изготавливаются мембраны – полипропилен. Поскольку мембраны являются пористыми, то перед концентрированием ее на несколько секунд помещают в соответствующий растворитель для заполнения пор экстрагентом. Это повышает эффективность использования мембраны. Недостаток метода заключается в том, что при вторичном использовании мембран проявляется эффект “памяти”, и они, по существу, являются одноразовыми.

Также нашли применение другие варианты мембранной экстракции: *трехфазная мембранная экстракция, экстракция во вращающуюся мембрану, парофазная мембранная экстракция, мембранная экстракция из капли в каплю.*

Микроэкстракция с диспергированием экстрагента. Скорость переноса вещества из воды в растворитель лимитируется диффузионным слоем и малой поверхностью массообмена. Отличительной особенностью метода, предложенного в 2006 году Резаи и Ассади является резкое увеличение поверхности массообмена диспергированием капли на микрочастицы. Для диспергирования предложено предварительно растворять экстрагент в третьем компоненте, который полностью смешивается с анализируемым раствором. Схема концентрирования представлена на рис. 3. При введении смеси в анализируемый раствор экстрагент выделяется в виде тонкодисперсной эмульсии с размером частиц в десятые-сотые доли микрона. Это приводит к тому, что общая поверхность массообмена увеличивается не менее чем в 10^4 – 10^5 раз. В результате этого межфазовое равновесие устанавливается не более чем за минуту. Агрегирование частиц эмульсии в отдельную фазу осуществляется центрифугированием.

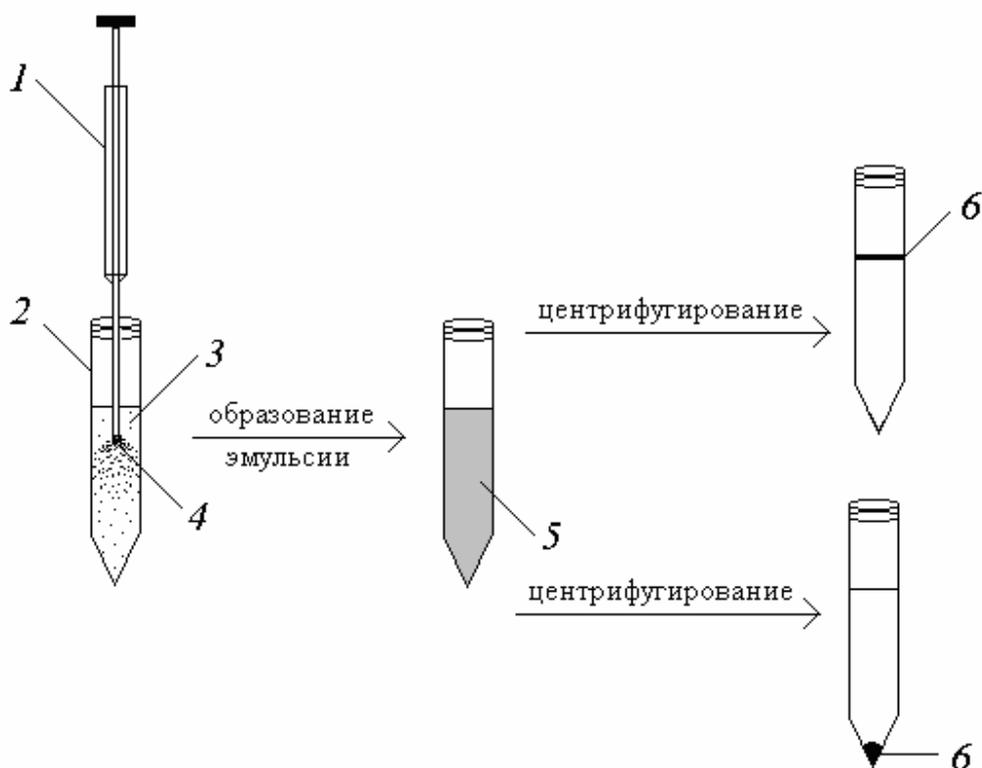


Рис. 4. Схема жидкостной микроэкстракции с диспергированием экстрагента: 1 – шприц; 2 – коническая пробирка; 3 – анализируемый раствор; 4 – диспергатор с растворенным в нем экстрагентом; 5 – образовавшаяся эмульсия; 6 – экстракт

Разработанный метод реализуется в двух вариантах, в первом – экстракт собирается на поверхности жидкости («сверху»), во втором – на дне центрифужной пробирки («снизу»). Область локализации экстракта определяется его плотностью относительно анализируемого раствора. Желательно, чтобы это различие было как можно большим. Недостатком является влияние диспергатора на коэффициенты распределения примесей. Для решения этой проблемы для диспергирования экстрагента стали применять ультразвуковое излучение. Использование ультразвука позволило значительно увеличить коэффициенты концентрирования примесей.

Требования, предъявляемые к экстрагенту:

1. Высокая чистота. Надежное определение низких концентраций примесей в экстракте возможно только лишь при использовании экстрагентов достаточной степени чистоты. В противном случае примеси, изначально содержащиеся в растворителе, будут ошибочно приняты за компоненты, извлеченные из водной фазы.

2. Низкая растворимость в воде ($\leq 10^{-2}\%$). Повышенная растворимость экстрагента в воде не только приведет к лишнему расходу растворителя, но и снизит коэффициент концентрирования примесей из воды. Это явление обусловлено повышением растворимости органических веществ при увеличении содержания растворенного в воде экстрагента (см. формулу).

3. Высокая эффективность концентрирования. Этот параметр определяется природой экстрагента. Справедливо правило: «подобное растворяется в подобном». Так, например, при концентрировании полициклических ароматических углеводородов хорошие результаты дает использование ароматических экстрагентов – толуола, бензола.

4 Относительно высокая температура кипения ($>60^{\circ}\text{C}$). При использовании легколетучих экстрагентов часть растворителя испаряется, что приводит к невоспроизводимости результатов.

5. Экстрагент не должен осложнять газохроматографический анализ. Растворитель не должен вызывать размывание хроматографических пиков, разрушать неподвижную фазу хроматографической колонки, вызывать коррозию элементов хроматографа, приводить к порче систем детектирования.

Таким образом, использование такого современного метода концентрирования примесей из воды, как жидкофазная микроэкстракция, позволяет решить ряд проблем, свойственных традиционным методам пробоподготовки:

- снижение расхода дорогостоящих экстрагентов на два-четыре порядка;
- решение проблемы утилизации высокотоксичных экстрагентов;
- существенное увеличение эффективности концентрирования

токсикантов;

- отсутствие проблемы «памяти» сорбента.

Кроме того, метод ЖФМЭ органично сочетается с газохроматографическим аналитическим окончанием.

1.2. Теоретические основы хроматографии

Хроматография – метод разделения смесей веществ или частиц, основанный на различии в скоростях их перемещения в системе несмешивающихся и движущихся относительно друг друга фаз.

В отличие от ряда других методов, основанных на распределении компонентов между фазами, хроматография – это динамический метод, обеспечивающий многократность актов сорбции-десорбции разделяемых компонентов, так как разделение происходит в потоке подвижной фазы. Этим обусловлена большая эффективность хроматографического метода по сравнению с методами сорбции и экстракции в статических условиях. Поэтому хроматография, как аналитический метод, получила широкое распространение в

различных областях: нефтехимия, фармакология, судебная экспертиза, медицина, контроль качества пищевых продуктов, экологический мониторинг. На сегодняшний день хроматография – наиболее часто используемый аналитический метод.

Авторство изобретения хроматографии принадлежит русскому ученому *Михаилу Семеновичу Цвету* (1903 г.). Цвету удалось разделить компоненты хлорофилла на колонке, плотно набитой зернами твердого адсорбента (минеральной соли). Для этого Цвет сверху в колонку заливал экстракт хлорофилла, затем промывал колонку чистым растворителем. При этом через некоторое время наблюдалось явление: по высоте трубки появлялись отдельно расположенные окрашенные зоны, расстояние между которыми увеличивалось по мере прибавления новых объемов чистого растворителя. Полученную цветную картину ученый назвал «*хроматограммой*», то есть «цветописью».

Классификация хроматографических методов

По агрегатному состоянию фаз хроматографию разделяют на *газовую, жидкостную, флюидную и полифазную*. В данных хроматографических методах в качестве подвижной фазы соответственно используются: газ, жидкость, газ в сверхкритическом состоянии, коллоидная система.

Газовая хроматография включает *газо-жидкостную* и *газо-адсорбционную (газо-твердофазную)*; жидкостная — *жидкостно-жидкостную, жидкостно-твердофазную* и *жидкостно-гелевую*; флюидная — *флюидно-адсорбционную, флюидно-жидкостную*. Первое слово в названии метода характеризует агрегатное состояние подвижной фазы, второе — неподвижной. В полифазной хроматографии в качестве неподвижной фазы используется композиция твердых и жидких компонентов.

По механизму взаимодействия сорбента и сорбата можно выделить несколько видов хроматографии: *распределительная хроматография* основана на различии в растворимости разделяемых веществ в неподвижной фазе (газо-жидкостная хроматография) или на различии в растворимости веществ в подвижной и неподвижной жидких фазах; *ионообменная хроматография* — на разной способности веществ к ионному обмену; *адсорбционная хроматография* — на различии в адсорбируемости веществ твердым сорбентом; *эксклюзионная хроматография* — на различии в размерах и формах молекул разделяемых веществ; *аффинная хроматография* — на специфических взаимодействиях; *лигандообменная хроматография* — за счет образования координационных связей разделяемых органических молекул с катионами металлов в привитых на поверхности адсорбента группах (лигандах); *хемосорбционная хроматография* — за счет образования водородной связи, проявления химического сродства.

По технике выполнения выделяют *колоночную* хроматографию, когда разделение проводится в специальных колонках, и *плоскостную* хроматографию,

когда разделение проводится на специальной бумаге (бумажная хроматография) или в тонком слое сорбента (тонкослойная хроматография).

Колоночная хроматография осуществляется на различных типах колонок:

Насадочная колонка – металлическая или стеклянная трубка, наполненная сорбентом. Диаметр колонки – несколько мм. Длина – 1-3 м.

Капиллярная колонка – стеклянная или кварцевая трубка, на внутреннюю поверхность которой нанесена жидкая или твердая неподвижная фаза. Диаметр колонки – 0.1-0.5мм. Длина – 10-60 м.

Микронасадочная колонка – занимает промежуточное место между насадочными и капиллярными колонками.

Поликапиллярная колонка – совокупность большого количества параллельно соединенных капиллярных колонок, имеющих одинаковую длину, диаметр и неподвижную фазу.

По цели хроматографирования выделяют *аналитическую* хроматографию (качественный и количественный анализ); *препаративную* хроматографию (для получения веществ в чистом виде, для концентрирования и выделения микропримесей); *промышленную* (производственную) хроматографию для автоматического управления процессом (при этом целевой продукт из колонки поступает в датчик).

По способу получения хроматограмм различают *элюентную*, *вытеснительную* и *фронтальную* хроматографии.

Фронтальная хроматография. В колонку непрерывно вводят раствор разделяемых веществ, сорбируемость которых увеличивается в ряду $A < B < C$. Из колонки сначала будет вытекать чистый растворитель, затем, когда сорбент насытится наименее сорбируемым веществом А, оно появится в *элюате*¹. Когда сорбент насытится веществом В, элюат будет содержать оба эти вещества и т. д. Когда же сорбент будет полностью насыщен всеми компонентами смеси, состав элюата совпадет с составом раствора, вводимого в колонку. При фронтальном способе получения хроматограммы в чистом виде можно выделить лишь одно вещество. Хроматограмма дает представление о числе компонентов в анализируемом растворе.

Вытеснительная хроматография. Сначала в колонку вводят небольшое количество раствора разделяемых веществ. Затем через колонку непрерывно пропускают раствор вещества (вытеснитель), обладающего большей сорбируемостью, чем любое из разделяемых веществ. По мере продвижения по колонке *элюент*² вытесняет вещество С, которое в свою очередь вытесняет вещество В, и т. д. В результате анализируемая смесь перемещается впереди фронта вытеснителя и скорость движения веществ равна скорости движения вытеснителя. Разделяемые вещества и на колонке, и в элюате располагаются

¹ Элюат – подвижная фаза, выходящая из колонки и содержащая разделенные компоненты.

² Элюэнт – подвижная фаза, вводимая в слой подвижной фазы.

последовательно друг за другом. Каждый из компонентов выделяется в чистом виде, но не количественно, так как зоны компонентов не разделены промежутками яистого сорбента.

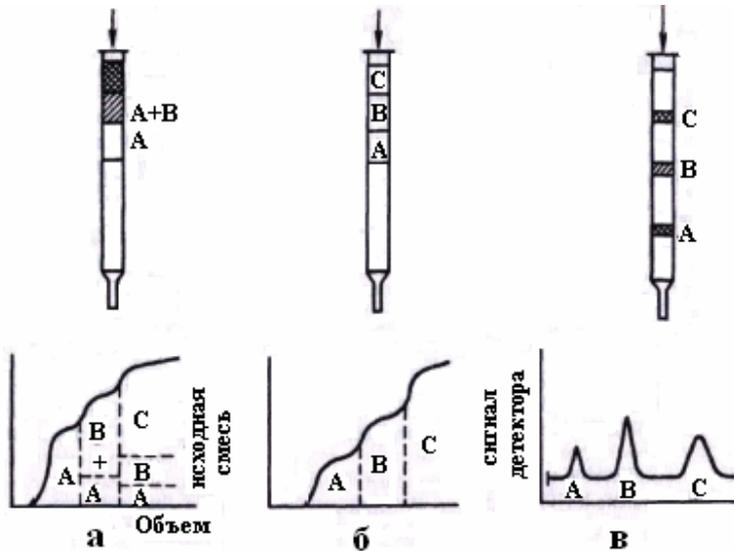


Рис. 5. Хроматограммы, полученные методом фронтальной (а), вытеснительной (б) и элюентной (в) хроматографии (сорбируемость веществ увеличивается в ряду $A < B < C$).

Элюентная (проявительная) хроматография. Хроматографическую колонку промывают элюентом (раствором или растворителем), обладающим меньшей сорбируемостью, чем любое из разделяемых веществ. Затем в колонку вводят разделяемые вещества, растворенные в элюенте, и продолжают непрерывно пропускать элюент (процесс элюирования). При этом разделяемые вещества перемещаются вдоль колонки с разными скоростями в соответствии с их сорбируемостью. Если скорости перемещения компонентов достаточно различаются, то на выходе из колонки сначала появляется наименее сорбируемый компонент, затем следующий компонент и т. д. В этом случае хроматограмма представляет собой несколько пиков, имеющих форму гауссовой кривой. Элюентная хроматография получила наибольшее распространение в современном хроматографическом анализе.

Основные хроматографические параметры

На рис. 6. представлена идеализированная хроматограмма смеси двух веществ. По оси абсцисс отложено время хроматографирования (можно отложить объем элюата), по оси ординат — аналитический сигнал, зависящий от концентрации веществ в элюате (отклик А). Хроматографический пик имеет форму гауссовой кривой. Рассмотрим основные хроматографические параметры, характеризующие поведение вещества в колонке.

Базовая линия – горизонтальная линия на хроматограмме, соответствующая минимальному значению сигнала (сигнал, получаемый в отсутствии элюируемых примесей).

Высота хроматографического пика (h) – расстояние от точки максимума до базовой линии.

Стандартное отклонение пика (σ) – половина расстояния между точками перегиба на кривой Гаусса. Точкам перегиба соответствует значение ординаты $0.607h$.

Ширина хроматографического пика (W) – расстояние между точками пересечения базовой линии и касательными к кривой Гаусса. Ширина хроматографического пика равна 4σ .

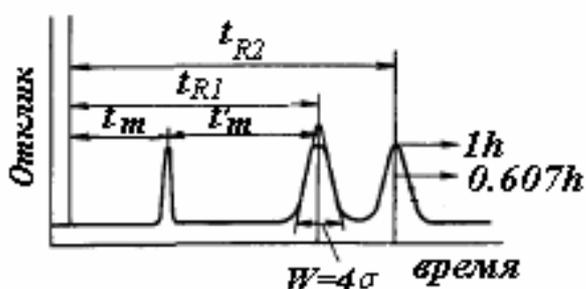


Рис. 6. Пример хроматограммы

Время от момента ввода анализируемой пробы до регистрации максимума пика называют *временем удерживания* (элюирования) t_R . Время удерживания складывается из двух составляющих — времени пребывания вещества в подвижной t_m и неподвижной t_s фазах:

$$t_R = t_m + t_s \quad (17)$$

Значение t_m фактически равно времени прохождения через колонку несорбируемого компонента. Значение t_R не зависит от количества пробы, но зависит от природы вещества и сорбента, а также упаковки сорбента и может меняться от колонки к колонке. Поэтому для характеристики истинной удерживающей способности следует ввести исправленное время удерживания t'_R :

$$t'_R = t_R - t_m \quad (18)$$

Для характеристики удерживания часто используют понятие удерживаемого объема V_R — объем подвижной фазы, который нужно пропустить через колонку с определенной скоростью, чтобы элюировать вещество:

$$V_R = t_R F, \quad (19)$$

где F — объемная скорость потока, $\text{см}^3 \cdot \text{с}^{-1}$.

Объем для вымывания несорбируемого компонента, мертвый объем, выражается через t_m :

$$V_m = t_m F \quad (20)$$

V_m включает в себя объем колонки, не занятый сорбентом, объем коммуникаций от устройства ввода пробы до колонки и от колонки до детектора. Исправленный удерживаемый объем соответственно равен

$$V'_R = V_R - V_m \quad (21)$$

При постоянных условиях хроматографирования (скорость потока, давление, температура, состав фаз) значения t_R и V_R строго воспроизводимы и могут быть использованы для идентификации веществ.

Количество вещества, вымываемого из колонки, можно найти по площади под кривой элюирования:

$$m = \int_0^{\infty} c dV, \quad (22)$$

где c — концентрация, ммоль/мл; V — объем, мл.

Любой процесс распределения вещества между двумя фазами характеризуется *коэффициентом распределения* D :

$$D = \frac{c_s}{c_m}, \quad (23)$$

где c_s — концентрация вещества в неподвижной фазе,
 c_m — концентрация вещества в подвижной фазе.

Селективность хроматографического разделения характеризуется *фактором разделения* α :

$$\alpha = \frac{t'_{R_2}}{t'_{R_1}} = \frac{V'_{R_2}}{V'_{R_1}} \quad (24)$$

Коэффициент селективности является мерой относительного удерживания или относительной подвижности разделяемых веществ. Это термодинамическая характеристика, зависящая при постоянной температуре только от природы разделяемых соединений и свойств подвижной и неподвижной фаз.

Другим важным хроматографическим параметром является *фактор емкости* k_e :

$$k_e = \frac{t'_R}{t_m} \quad (25)$$

Эта величина показывает, во сколько раз вещество дольше находится в неподвижной фазе, чем в подвижной; Как правило, значения k_e лежат в пределах 1,5—4. Оптимальным является $k_e = 2$.

Изотермы распределения разделяемых компонентов

Хроматографическое разделение определяется различной сорбцией компонентов смеси, что связано с природой сорбента и разделяемых веществ. На основании сведений по термодинамике сорбции (адсорбции, растворения или ионного обмена) можно судить о возможности разделения смеси веществ. 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 или вогнутой.

Если *изотерма линейна* ($D = \text{const}$), зона симметрична. Концентрация вещества максимальна в центре зоны и симметрично убывает к краям. Каждый компонент зоны перемещается с постоянной скоростью, поскольку линейная скорость миграции на единицу длины колонки (v) зависит от скорости потока F (которую устанавливают постоянной) и D :

$$v = \frac{F}{V_R} = \frac{F}{V_m + DV_s} \quad (26)$$

С такой же скоростью перемещается вся зона, оставаясь симметричной. Следовательно, симметричен пик на хроматограмме. Такие пики характерны для *линейной хроматографии*. Это идеальный случай. Однако на практике симметричные пики получаются, когда количества вводимых в колонку веществ малы.

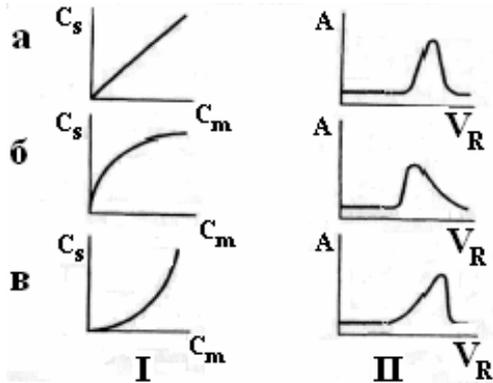


Рис. 7. Зависимость формы хроматографического пика (I) от вида изотермы (II): *a* - линейная, *б* – выпуклая, *в* - вогнутая.

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, а пик получается несимметричным.

При *вогнутой изотерме*, напротив, образуется резкий тыл хроматографического пика. Реализация вогнутой изотермы распределения основного компонента используется в *методе бинарных фаз переменной*

емкости³. В основе подхода лежит использование основного компонента в качестве дополнительной неподвижной фазы колонки. Это позволяет увеличить эффективность хроматографического разделения компонентов, выходящих после вещества-основы. Вогнутая изотерма распределения реализуется при вводе больших проб в колонку и температурном режиме хроматографического разделения, при котором температура колонки меньше температуры кипения основного компонента.

Теория теоретических тарелок

Теория теоретических тарелок, общая для всех многостадийных процессов (например, противоточная экстракция), впервые была предложена для описания процесса дистилляции. Мартин и Синдж распространили ее на хроматографические системы. Теория 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 (ионов) 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 и высотой теоретической тарелки. Так как хроматографический процесс непрерывен и неравновесен, 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.

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:

³ Этот подход встречается в литературе под названием *хроматодистилляция* или *хроматография паров, близких к насыщенным*

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 = \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2 \quad (27)$$

или

$$N = 5.54 \left(\frac{t_R}{w_{0.5}} \right)^2 \quad (28)$$

Определив N и зная длину колонки, легко вычислить H :

$$H = \frac{L}{N}, \quad (29)$$

где L — длина колонки.

Теория теоретических тарелок 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.

Кинетическая теория хроматографии

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

$$H = A + B/v + Cv, \quad (30)$$

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

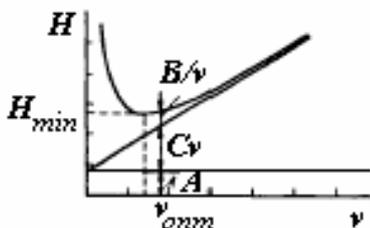


Рис. 8. Зависимость высоты, эквивалентной теоретической тарелке, от линейной скорости потока

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

$$A = 2\lambda d_p \quad (31)$$

где λ — коэффициент гомогенности упаковки колонки; d_p — диаметр частиц сорбента.

Молекулярная (продольная) диффузия B/v . Размывание полосы за счет молекулярной диффузии обусловлено миграцией молекул главным образом в подвижной фазе из участков полосы с большей концентрацией в направлении, где концентрация меньше, и описывается уравнением

$$B = 2\lambda D_m, \quad (32)$$

где λ — 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 $D_{ж}$ значительно (на 3—4 порядка) ниже, чем в газе.

Сопротивление массопереносу C_v . Член C_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 C_v характеризует скорость распределения вещества между двумя фазами, что описывается уравнением:

$$C_v = \frac{8}{\pi^2} \frac{k_e}{(1+k_e)^2} \frac{d_s^2}{D_s} v \quad (33)$$

Чем толще пленка неподвижной фазы d_s и меньше коэффициент диффузии вещества в неподвижной фазе D_s , тем сильнее размывается пик за счет замедления массопереноса в неподвижной фазе. Поскольку фактор емкости колонки k_e пропорционален объему неподвижной фазы, размывание с увеличением объема неподвижной фазы V_s должно уменьшаться. Если при этом увеличивается толщина слоя неподвижной фазы, а влияние d_s^2 преобладает, то размывание увеличивается. Влияние этого фактора неоднозначно.

Из уравнения Ван-Деемтера

$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_m}{v} + \frac{8}{\pi^2} \frac{k_e}{(1+k_e)^2} \frac{d_s^2}{D_s} v \quad (34)$$

следует, что 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. На рис. приведена зависимость H от скорости потока. Минимум на кривой объясняется тем, что

диффузия вносит основной вклад в величину H при низких скоростях потока, а при высоких скоростях преобладает влияние массопереноса. Минимум на кривой соответствует оптимальной скорости подвижной фазы, при которой колонка работает наиболее эффективно. Напомним, что чем меньше H , тем эффективнее колонка. Область под гиперболой можно поделить на три части, соответствующие трем членам уравнения Ван-Деемтера. Из этого также следует, что для повышения эффективности колонки необходимо уменьшить размер частиц, улучшить упаковку, подбирать оптимальную линейную скорость потока (при которой H минимальна) и маловязкие неподвижные фазы (толщина их в ГЖХ должна быть небольшой).

Разрешение хроматографических пиков

Разделение двух соседних пиков характеризуется разрешением R_s (разрешение пиков), которое описывается уравнением:

$$R_s = \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{(w_2 + w_1)/2}, \quad (35)$$

где w_1 и w_2 – ширина пиков, измеренная у их основания.

Разрешение — функция эффективности N , коэффициента селективности α и емкости k_e колонки:

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_e}{1 + k_e} \right) \quad (36)$$

Из этого уравнения легко рассчитать число теоретических тарелок, необходимое для разделения с заданным разрешением:

$$N = 16R_s^2 \left(\frac{1 + k_e}{k_e} \right)^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \quad (37)$$

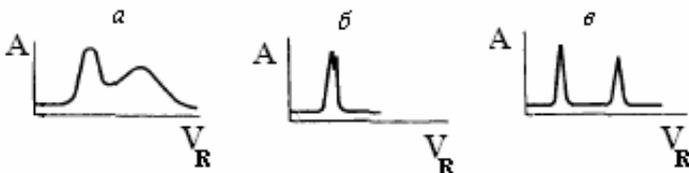


Рис. 9. Зависимость степени разделения смеси двух веществ от эффективности колонки и селективности сорбента. а – высокая селективность, но плохая эффективность; б – высокая эффективность, но плохая селективность; в – высокая эффективность, достаточная селективность.

Сравнение возможностей капиллярных и насадочных колонок

Важнейшей характеристикой любого аналитического метода является *предел обнаружения* – наименьшее содержание примеси, которое можно обнаружить с заданной доверительной вероятностью.

Абсолютный предел обнаружения хроматографического метода описывается выражением:

$$Q_{\min} = \sqrt{2\pi} \frac{3S_x}{S} \frac{t_R}{\sqrt{N}}, \quad (38)$$

где S_x – стандартное отклонение холостого опыта;

S – чувствительность детектора.

Следующее выражение позволяет сравнить предельные возможности хроматографии на капиллярных и насадочных колонках:

$$\frac{Q_{\min}^K}{Q_{\min}^H} = \frac{t_R^K}{t_R^H} \sqrt{\frac{N_H}{N_K}}, \quad (39)$$

где Q_{\min}^K , t_R^K , N_R^K – абсолютный предел обнаружения примесей, время удерживания, эффективность в случае использования капиллярных колонок;

Q_{\min}^H , t_R^H , N_R^H – абсолютный предел обнаружения примесей, время удерживания, эффективность в случае использования насадочных колонок.

Учитывая, что время удерживания при проведении хроматографического разделения на капиллярных колонках, сокращается в 5-20 раз, а эффективность разделения увеличивается в 30-140 раз, из формулы (39) следует, что абсолютный предел детектирования в случае использования капиллярных колонок снижается в 30-230 раз.

Несколько худшие результаты показывают капиллярные колонки для *относительного предела обнаружения*:

$$C_{\min} = \frac{Q_{\min}}{V_{np}}, \quad (40)$$

где V_{np} – объем пробы.

Это обусловлено тем, что объем пробы, вводимой в капиллярную колонку, существенно меньше, чем объем пробы, вводимой в насадочную колонку. Несмотря на это, предельные возможности капиллярной хроматографии все же лучше, чем для насадочной. Существуют приемы, позволяющие увеличить объем вводимой в колонку пробы с сотых-десятых долей микролитра (обычная рабочая доза) до нескольких микролитров (экстремально большая величина для капиллярной колонки). К таким приемам относятся метод бинарных фаз переменной емкости и *термофокусирование* примесей на начальном участке колонки.

Снижение предела обнаружения, увеличение экспрессности хроматографического анализа и эффективности разделения примесей в случае использования капиллярных колонок обусловило их широкое распространение и повсеместное доминирование в аналитической практике над насадочными колонками.

Идентификация примесей и определение их содержания в образце с помощью хроматографии

Качественный анализ

Идентификация хроматографическими методами — это прежде всего идентификация по параметрам удерживания (t_R , V_R), которые характеризуются хорошей воспроизводимостью, относительные стандартные отклонения не превышают 0.02. Совпадение величин удерживания неизвестного и стандартного соединений свидетельствует о том, что эти соединения могут быть идентичными. Если различные вещества имеют одинаковое время удерживания, то для большей достоверности идентификации сравнение хроматографических параметров известного и неизвестного веществ проводят в сильно различающихся условиях. Например, получают данные об их хроматографическом поведении на колонках с различными неподвижными фазами. Если хроматографическое поведение стандартного и неизвестного веществ в таких случаях идентично, то достоверность идентификации возрастает до 99%.

При сравнении хроматограмм, полученных на разных приборах, во избежание ошибок в идентификации используют исправленное время удерживания и исправленный удерживаемый объем. Часто идентификацию проводят по относительному удерживанию, т. е. по отношению удерживаемого объема определяемого компонента к удерживаемому объему вещества, принятого за стандарт:

$$t_{\text{ОТН}} = \frac{t_R}{t_{R,CT}} = \frac{V_R}{V_{R,CT}} \quad (41)$$

Эта величина зависит только от состава подвижной и неподвижной фаз.

Для качественной идентификации удобно пользоваться индексами удерживания Ковача, которые, по существу, также являются относительными параметрами удерживания. В этом случае за стандарт берут два соседних алкана, один из которых элюируется до, а второй после исследуемого соединения, т. е. $t'_{R(z)} < t'_{R(x)} < t'_{R(z+1)}$, где z — число атомов углерода в алкане. Логарифмический индекс удерживания рассчитывают по формуле

$$I = 100 \frac{\lg t'_{R(x)} - \lg t'_{R(z)}}{\lg t'_{R(z+1)} - \lg t'_{R(z)}} + 100z \quad (42)$$

Для любого n -алкана $I = 100z$. Для всех других соединений можно определять индекс Ковача относительно шкалы измерения n -алканов, используя справочные таблицы.

Идентификация по индексам удерживания более надежна, чем по относительным удерживаемым объемам, поэтому их используют не только для идентификации, но и для сравнительной оценки селективности неподвижных фаз.

Закономерность изменения параметров удерживания (V'_R , t'_R) в гомологическом ряду органических соединений также создает основу для идентификации. Например, в ГХ используют зависимость логарифма

исправленного удерживаемого объема от числа углеродных атомов z в соединениях и от температуры кипения ($T_{кип}$) при постоянной температуре колонки:

$$\lg V'_R = A + Bz, \quad (43)$$

$$\lg V'_R = A + B T_{кип}, \quad (44)$$

где A и B — произвольные константы, зависящие от условий анализа, функциональной группы гомологического ряда

Если установлено, что соединение относится к данному гомологическому ряду, то для его идентификации достаточно знать характеристики удерживания нескольких членов гомологического ряда. Найденные графически и вычисленные по уравнениям $T_{кип}$ или индексы удерживания $100z$ используют для идентификации гомологов.

Существует еще один способ идентификации, основанный на одновременном использовании двух детекторов. Один детектор неспецифичен (катарометр, пламенно-ионизационный детектор), а интенсивность сигнала другого детектора зависит от природы вещества, например электрозахватный или пламенно-фотометрический детектор. Сравнение хроматограмм, полученных с помощью двух детекторов, дает информацию, например, о составе и функциональных группах органических веществ.

Наибольшими возможностями идентификации обладает метод хромато-масс-спектрометрии. Вещества идентифицируются по масс-спектрам, характерным для каждого соединения. Библиотеки масс-спектров содержат сотни тысяч масс-спектров.

Количественный анализ

Количественный анализ проводят, измеряя высоту или площадь пика, так как эти параметры пропорциональны концентрации или количеству вещества в хроматографической зоне. Площади измеряют чаще, так как последние практически не изменяются при некоторой нестабильности экспериментальных условий.

Методы расчета хроматограмм. Используя данные по высотам пиков или их площадям, можно рассчитать количественный состав пробы методами *абсолютной градуировки*, *нормировки* (с использованием или без использования поправочных коэффициентов), *внутренней стандартизации*.

Наиболее распространенным является метод *абсолютной градуировки*. Он заключается в построении линейных градуировочных зависимостей в координатах площадь пика – масса (или концентрация) введенного в хроматограф вещества.

Метод нормировки. Для его использования необходимо, чтобы на хроматограмме были зарегистрированы все компоненты, входящие в состав анализируемой смеси. Доля площади пика соответствует содержанию компонента в массовых процентах. При анализе смеси трех компонентов относительное

содержание компонента, например соответствующего пику x на хроматограмме, можно рассчитать по формуле

$$x, \% = \frac{S_x}{S_x + S_y + S_z} 100, \quad (45)$$

где S_x, S_y, S_z — площади пиков. Эту формулу используют только в том случае, если детектор одинаково чувствителен к каждому из разделяемых компонентов смеси, т. е. компоненты смеси, взятые в одинаковых количествах, дают одну и ту же площадь пика.

Если же чувствительность детектора различна по отношению к каждому из компонентов пробы, то используют поправочные коэффициенты f_x, f_y, f_z , учитывающие чувствительность детектора к данному компоненту. Формула для расчета в этом случае записывается так:

$$x, \% = \frac{S_x f_x}{\sum S_n f_n} 100 \quad (46)$$

Поправочные коэффициенты получают при анализе стандартных серий и рассчитывают по формуле:

$$f_x = \frac{S_{\tilde{N}T}}{S_x} \frac{c_x}{c_{CT}} f_{CT}, \quad (47)$$

где S_x, S_{cm} - площади пиков определяемого и стандартного вещества;

c_x, c_{cm} — концентрации определяемого и стандартного вещества;

f_{cm} — поправочный коэффициент стандартного вещества.

Метод внутреннего стандарта применяют при отсутствии на хроматограмме пиков некоторых компонентов анализируемой смеси. Метод основан на том, что в анализируемую смесь вводят некоторое определенное количество стандартного вещества. Это вещество должно быть химически инертным и отсутствовать в определяемой пробе и полностью отделяться от других компонентов смеси; время его удерживания должно быть близким к t_R определяемых компонентов; его концентрация должна быть близка к концентрациям определяемых компонентов, пик симметричным. Для определения поправочных коэффициентов (нормировочных множителей) составляют различные смеси (известного состава) внутреннего стандарта с каждым из компонентов; получают хроматограммы таких смесей. Определяют площади пиков, и для каждого компонента рассчитывают поправочный коэффициент по формуле

$$k = \frac{S_{B,CT}}{S_x} \frac{c_x}{c_{B,CT}}, \quad (48)$$

где $S_{в.см}, S_x$ — площади пиков внутреннего стандарта и определяемого компонента;

$C_{в.см}$, C_x - — концентрации стандарта и исследуемого вещества в искусственных смесях.

Зная поправочные коэффициенты, содержание компонента рассчитывают по формуле

$$x, \% = kr \frac{S_x}{S_{в.см}} 100, \quad (49)$$

где $m = m_{в.см} / m_{пробы}$ (m — масса, г).

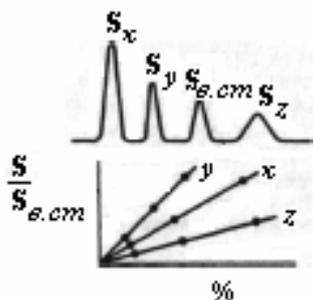


Рис. 10. Определение компонентов методом внутреннего стандарта

Хроматография является гибридным аналитическим методом, в котором хроматографическая колонка – часть аналитической системы, сочетающей разделение и определение. Не менее важное место в хроматографическом методе также занимает *детектирование* сигнала.

1.3. Детектирование в газовой хроматографии

Детектор представляет собой прибор, входящий в состав газохроматографической системы и измеряющий такие параметры, по которым можно получить основные результаты анализа – относительное количество анализируемого компонента в смеси и соответствующее время удерживания. Принцип действия детектора основан на измерении и регистрации свойств протекающего через него газа, изменяющихся в момент появления в газе-носителе компонентов пробы. Пока через детектор протекает газ-носитель, детектор выдает постоянный сигнал (электрический ток или напряжение), который регистрируется программой компьютера в виде нулевой линии. Изменения сигнала детектора, вызванные прохождением через него компонентов пробы, фиксируются программой в виде серии пиков.

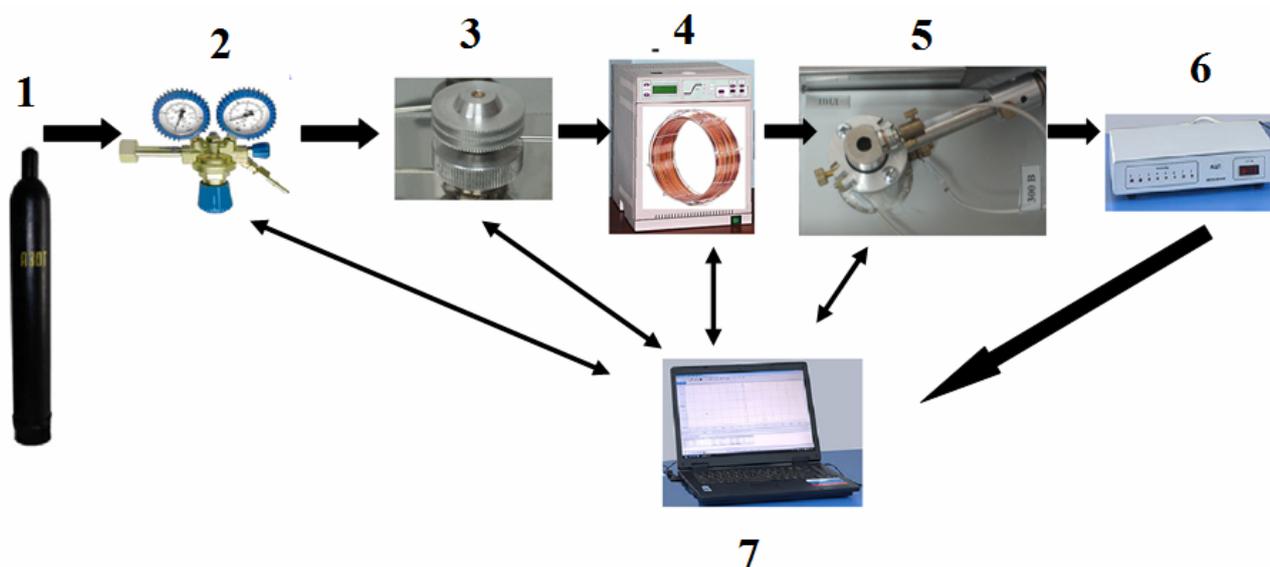


Рис. 11. Схема газового хроматографа. 1 – баллон с газом-носителем, 2 – система регулировки подачи газа, 3 – система ввода пробы (испаритель), 4 – термостатируемая хроматографическая колонка, 5 – детектор, 6 – аналого-цифровой преобразователь, 7 – компьютерная система контроля параметров хроматографа, приема сигнала и обработки данных.

1.4. Пламенно-ионизационный детектор

Пламенно-ионизационный детектор (ПИД) является одним из наиболее распространенных и популярных детекторов в газовой хроматографии. Впервые ПИД был предложен и описан в 1958 г. Мак-Вильямом и Дьюаром.

ПИД обладает высокой чувствительностью и имеет предел детектирования примерно того же порядка, как и большинство ионизационных детекторов. ПИД имеет чрезвычайно высокий линейный динамический диапазон (до 10^7), что дает ему ряд преимуществ при проведении количественных анализов. Детектор прост по конструкции, обладает малым рабочим объемом и малой инерционностью. Его широко применяют с капиллярными и микронасадочными колонками. ПИД мало чувствителен к колебаниям расхода газа-носителя, давления и температуры, поэтому его применяют при анализах с программированием температуры в колонке. Детектор чувствителен к большинству органических соединений. ПИД практически не чувствителен к воде в газе-носителе и пробе, в связи с чем он находит достаточно широкое применение при анализе проб, содержащих воду, в том числе проб окружающей среды.

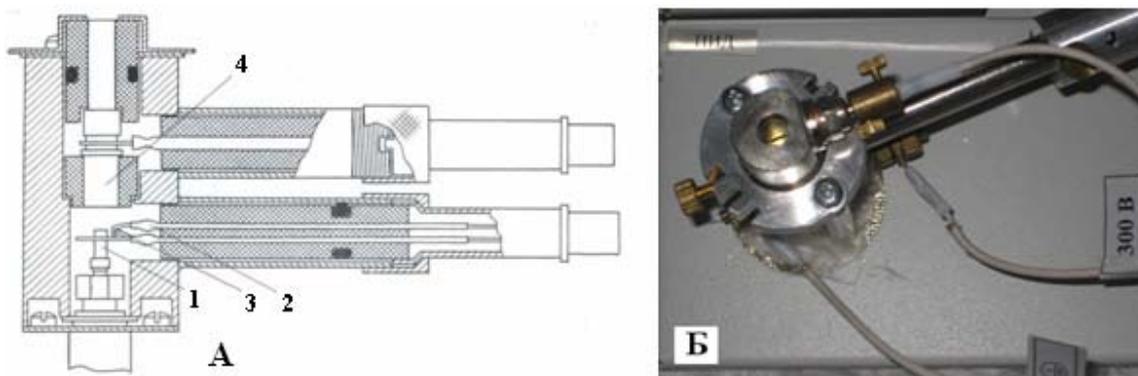


Рис. 12. Современный пламенно-ионизационный детектор. А – схема, вид сбоку (1 – сопло, 2 – подача напряжения, 3 – спираль зажигания пламени, 4 – коллекторный электрод); Б – фотография (вид сверху).

В детекторе установлен источник ионизации, которым является водородное пламя, для ионизации пробы, выходящей из хроматографической колонки и попадающей вместе с газом-носителем в пламя. В детекторе имеется два электрода, потенциальный и коллекторный; к первому прикладывается напряжение для сбора ионов, со второго снимается сигнал детектора (см. рис. 13).

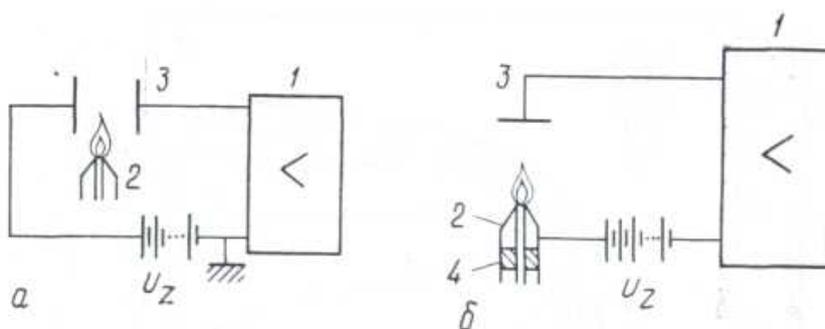


Рис. 13. Принципиальная схема расположения сопла и электродов. а – обычный двухэлектродный детектор, б – детектор, в котором одним из электродов является горелка.

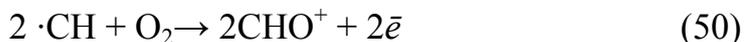
Возникновение сигнала в пламенно-ионизационном детекторе.

Как установили Бонхоффер и Габер, в пламени, образующемся при горении чистого водорода, присутствует чрезвычайно малое число ионов (преимущественно гидроксид-ионы). Однако если внести в такое микропламя, горящее между двумя электродами, органическое вещество, то при напряженности электрического поля около 300 В/см первоначальный ток порядка 10^{-12} А резко возрастает, что можно объяснить только появлением в нем ионов или свободных электронов.

Внесенные в пламя органические компоненты подвергаются пиролизу в достаточно горячей, однако неокисляющей зоне пламени, в результате которого образуются в основном радикалы $\cdot\text{CN}$ по схеме:

органическое вещество $\rightarrow \cdot\text{CN}$

Эти радикалы реагируют далее в окислительной зоне пламени по следующей схеме:



с образованием молекулярных ионов и электронов, обеспечивающих протекание тока, т. е. появление сигнала детектора.

В ПИД применяют три газа: газ-носитель, водород и воздух. В качестве газа-носителя чаще всего используют азот, иногда водород или гелий. Водород и воздух необходимы для горения пламени. Ко всем газам предъявляются следующие требования: в газах не должно содержаться примесей органических веществ и солей щелочных металлов. Для получения нужной температуры пламени необходимо правильное соотношение азота и водорода.

ПИД — типичный потоковый детектор, поэтому его показания не зависят от расхода газа-носителя и определяются количеством вещества, поступающего в детектор в единицу времени (например, в г/с).

ПИД не может быть использован для определения, например, таких соединений, как: COS , CS_2 , SO_2 , NO , NO_2 , H_2S , H_2O , CO , CO_2 , H_2O , SiCl_4 , NH_3 , HCOOH , $(\text{COOH})_2$, SiF_4 и некоторых других. Следует особо отметить, что ПИД не только не чувствителен к перечисленным соединениям, но его чувствительность к другим соединениям не изменяется в их присутствии, если концентрации этих соединений не настолько велики, чтобы изменить состав пламени. Это свойство отличает ПИД от большинства других ионизационных детекторов и дает ему неоспоримые преимущества, особенно при обнаружении загрязнений в воздухе и анализе водных смесей, таких как спиртные напитки, биологические и пищевые экстракты. Среди других характеристик ПИД можно отметить следующие: высокое быстродействие (малая постоянная времени); небольшой рабочий объем (возможность применения с капиллярными колонками); максимальная температура использования до 500°C ; дешевый газ-носитель (N_2); сравнительно низкая стоимость детектора. Недостатками ПИД являются: нечувствительность к ряду соединений; деструктивность; взрывоопасность (в связи с применением H_2).

1.5. Масс-спектрометрический детектор

Метод масс-спектрометрии.

Масс-спектрометрический метод анализа основан на ионизации атомов и молекул изучаемого вещества и последующем разделении образующихся ионов в пространстве или во времени. Первые масс-спектры были получены в Великобритании Дж. Дж. Томсоном (1910), а затем Астоном (1919). Вначале масс-

спектрометрия применялась преимущественно для определения изотопного состава элементов и измерения их атомных масс. Наиболее важное применение получила масс-спектрометрия для идентификации и установления структуры органических соединений. Вполне логичным является молекулярный анализ сложных смесей органических соединений после предварительно проведенного хроматографического разделения.

Аналитическая масс-спектрометрия характеризуется рядом отличительных качеств:

- высокая чувствительность определения;
- универсальность – возможность определения широкого круга веществ: от элементов до сложных белковых молекул;
- высокая специфичность и селективность.

Принцип работы масс-спектрометров

Существуют различные способы ионизации атомов и молекул, специфичные для конкретной цели анализа:

- Электронный удар;
- Химическая ионизация;
- Искровой разряд;
- Лазерное излучение;
- Бомбардировка пучком ионов (ионный удар).

Несмотря на развитие альтернативных методов ионизации, наибольшее число исследований, особенно в органическом структурном анализе, проводят с использованием ионизации электронным ударом.

Ионизованные молекулы и атомы по их массам разделяют в масс-спектрометре, схема основных узлов которого приведена на рис. . Он состоит из устройства для ввода пробы, в которое газы вводят непосредственно, а жидкости испаряют заранее или в приборе. Задача системы напуска заключается во вводе такого количества газообразной пробы, чтобы обеспечить давление $10^{-5} - 10^{-4}$ мм рт. ст. в ионном источнике, где молекулы ионизируются. При ионизации электронным ударом электроны испускаются раскаленным катодом, соударяются по пути к аноду с молекулами введенного вещества и часть этих молекул электроны ионизируют. Образующиеся ионы выводятся из зоны ионизации, ускоряются электрическим полем и одновременно фокусируются в пучок (узел ускорения и фокусировки ионов). Нейтральные молекулы удаляются вакуумным насосом. Все узлы прибора находятся под высоким вакуумом (вакуумная система), который обеспечивает необходимую длину свободного пробега ионов. Поток ускоренных ионов попадает в масс-анализатор, где ионы разделяются по массе. Разделенные пучки ионов затем попадают в детектор, где ионный ток

преобразуется в электрический сигнал, который усиливается усилителем и обрабатывается компьютером.

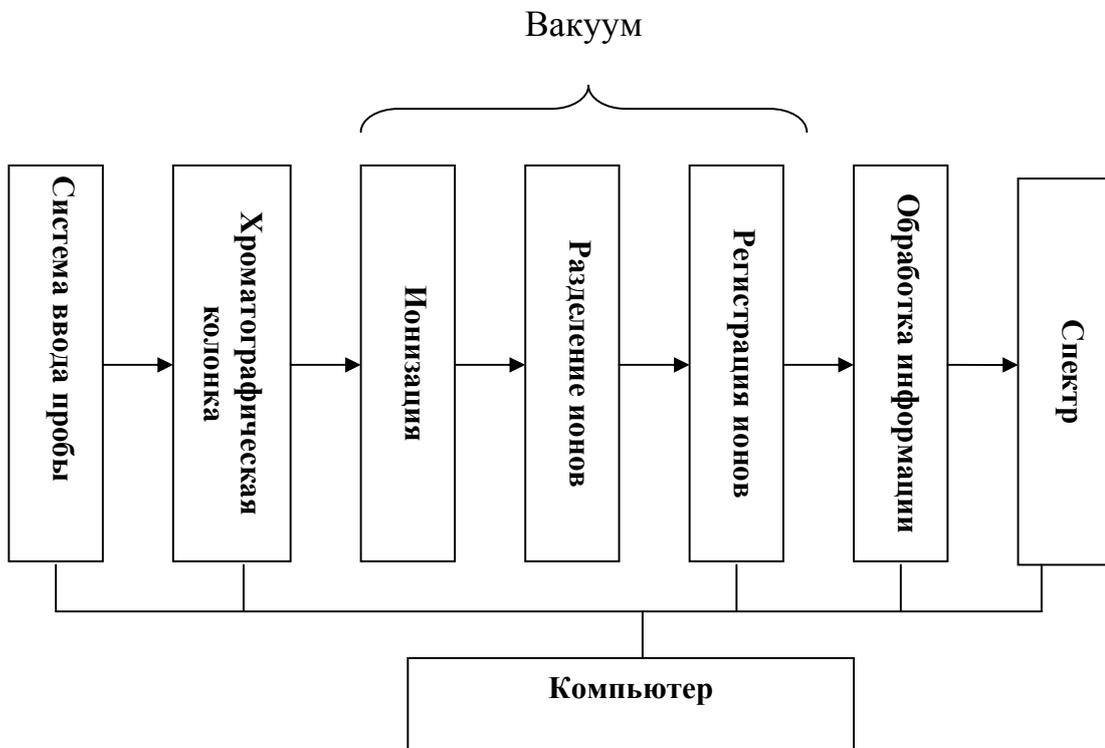


Рис. 14. Блок-схема хромато-масс-спектрометра

Классификация масс-спектрометров.

Масс-спектрометры классифицируют по принципу, используемому для разделения ионов по массе. Наиболее распространены *магнитные* и *квадрупольные* масс-спектрометры, но применяют также масс-анализаторы, основанные на принципе «ионной ловушки» и времени пролета ионов. Любой из этих типов масс-спектрометра сочетается с газовым хроматографом.

В магнитных масс-спектрометрах для разделения ионов в масс-анализаторах используют однородное магнитное поле. В этом случае процессы ускорения ионов в электрическом поле и разделения их в магнитном поле могут быть описаны количественно. В источнике ионов под воздействием ускоряющего напряжения U_0 ионы приобретают кинетическую энергию $E = z U_0 = 1/2 m V^2$, где z – заряд иона, m - масса иона, V - скорость иона. Отсюда

$$v = \sqrt{\frac{2U_0 z}{m}} \quad (51)$$

Таким образом, при постоянном ускоряющем напряжении скорость ионов определяется отношением их заряда к массе.

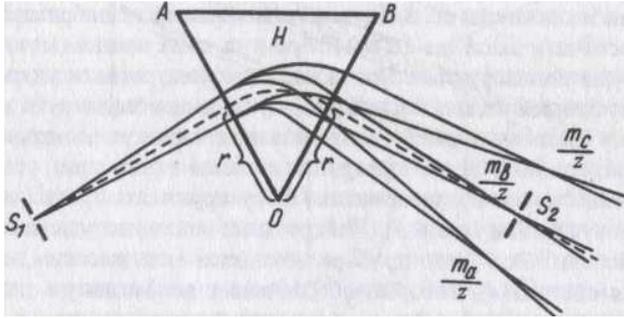


Рис. 15. Схема масс-спектрометра с магнитным масс-анализатором.

Заряженные ионы, ускоренные и сформированные в пучок, попадая в масс-анализатор через входную диаграмму S_1 , сначала расходятся, а затем, описав окружность с радиусом r , фокусируются на щель S_2 . При этом на ион, движущийся по круговой траектории, действует центростремительная сила $F_{uc} = Hzv$ (где H – напряженность магнитного поля) и центробежная сила $F_{уб} = mv^2/r$.

Условием прохождения пучка ионов по траектории радиуса r является равенство центробежной и центростремительной сил:

$$Hzv = mv^2/r \quad (52)$$

Отсюда получаем:

$$r = \frac{1}{H} \sqrt{2U_0 m/z} \quad (53)$$

Таким образом, при постоянной напряженности магнитного поля H , ускоряющего потенциала U траектория ионов с разными отношениями m/z будут иметь разные радиусы кривизны, в то время как для ионов с одним и тем же отношением m/z радиус одинаков.

В квадрупольных масс-спектрометрах разделение ионов осуществляется при прохождении ионного пучка вдоль оси между четырьмя параллельными стержнями, к которым одновременно приложено постоянное и переменное высокочастотное напряжение. Между стержнями создается поле с гиперболическим распределением потенциала. При фиксированных значениях частоты ω и амплитуды U переменного поля только ионы с определенным значением m/z проходят через анализатор, попадая на коллектор ионов. При этом выполняется соотношение:

$$m = kU/\omega^2, \quad (54)$$

где k – постоянная прибора.

Амплитуда колебаний ионов с другим отношением m/z нарастает по мере их движения между стержнями квадрупольного поля так, что эти ионы достигают стержней и нейтрализуются. Чтобы их зафиксировать, изменяют либо частоту, либо амплитуду высокочастотного переменного поля. Таким образом, ионы с разной массой регистрируются при разных значениях частоты (или амплитуды) переменного поля, в результате чего формируется масс-спектр.

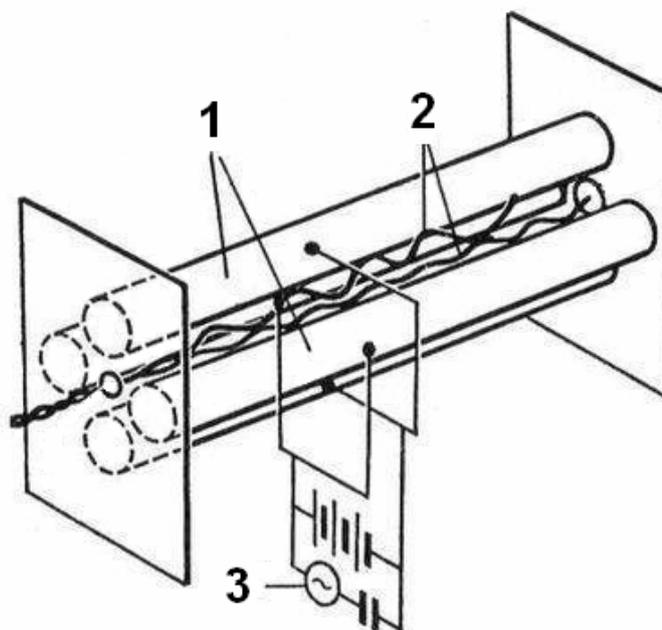


Рис. 16. Квадрупольный масс-анализатор (1 – металлические стержни, 2 – пучок ионов, 3 – питание стержней квадруполя).

Одной из разновидностей квадрупольного масс-анализатора является «ионная ловушка», называемая иногда пространственным квадруполем. Особенностью ее является совмещение области ионизации и анализа. После ионизации (электронным ударом) определяемых молекул образующиеся ионы, имеющие значение m/z больше некоторого заданного, удерживаются в электронной ловушке полем квадруполя. Это поле формируется за счет приложения радиочастотного напряжения ($U \cos \omega t$) между кольцевым и торцевыми электродами. При увеличении амплитуды радиочастотного поля (пропорционально растет нижняя граница интервала m/z ионов, которые удерживаются в ловушке. Поэтому рост U приводит к тому, что ионы в порядке увеличения их m/z быстро покидают область удерживания и достигают детектора (электронного умножителя).

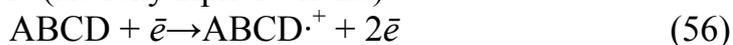
Во *время-пролетном* масс-анализаторе образующиеся в ионном источнике ионы очень коротким электрическим импульсом «впрыскиваются» в анализатор длиной L . Так как скорость ионов, имеющих разную массу, неодинакова, то и время пролета t через анализатор

$$t = L \sqrt{\frac{m}{2zU}} \quad (55)$$

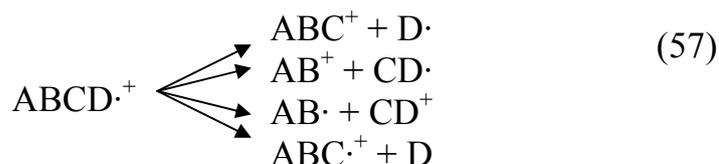
определяется при постоянных L и U отношением m/z .

Механизм ионизации.

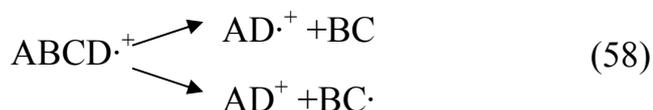
При бомбардировке электронами молекулы органических соединений теряют один электрон с образованием положительно заряженного катион-радикала (молекулярного иона)



С увеличением энергии электронов молекулярный ион распадается (фрагментация):



и одновременно происходят внутримолекулярные перегруппировки



Таким образом, при ионизации молекулы возникает большое число осколков. Появление молекулярного иона в масс-спектре наблюдается при энергии электронов, соответствующей энергии ионизации органического соединения. Для большинства соединений эти энергии составляют 7—13 эВ. Вероятность образования и устойчивость молекулярного иона для разных соединений различна. π -системы образуют более стабильные молекулярные ионы, чем σ -системы. По вероятности образования молекулярного иона и его устойчивости классы органических соединений можно расположить в следующий ряд: ароматические соединения > олефины > алициклические соединения > неразветвленные углеводороды > кетоны > амины > эфиры > карбоновые кислоты > разветвленные углеводороды > спирты.

Относительные интенсивности пиков ионов, образующихся при ионизации электронным ударом, зависят от двух основных параметров: энергии ионизирующих электронов и температуры, при которой происходит ионизация. На рис. 17. представлена зависимость числа молекулярных и фрагментных ионов от энергии ионизирующих электронов. По мере роста энергии электронов, начиная от нуля, при достижении энергии около 10 эВ начинают появляться молекулярные ионы. Это значение энергии называется потенциалом появления. При дальнейшем увеличении энергии электронов число образующихся молекулярных ионов растет и становится приблизительно постоянным при энергии порядка 50 эВ. В интервале энергий от 10 до 15 эВ начинают регистрироваться фрагментные ионы. При энергии ионизирующих электронов, равной 70 эВ, масс-спектр получается в условиях стабильного формирования

ионов, что обеспечивает воспроизводимые и характеристичные масс-спектры ионизируемых молекул.

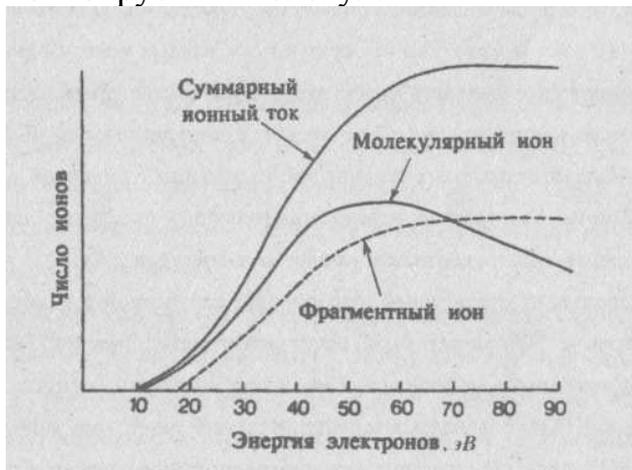


Рис. 17. Образование иона как функция энергии ионизирующих электронов

Регистрация и обработка сигнала в хромато-масс-спектрометрии.

Основным детектором ионов в масс-спектрометре является вторично-электронный умножитель (ВЭУ). Все большее распространение получают фотоэлектронные системы детектирования, в которых регистрируется фотоизлучение, возникающее в результате бомбардировки люминофорного экрана ионами. Эти системы имеют несколько большую чувствительность и долговечность, чем ВЭУ.

В хромато-масс-спектрометрии получают данные непрерывным сканированием масс-спектров элюата, выходящего из хроматографической колонки. В результате сканирования в памяти компьютера накапливается последовательность чисел-значений m/z и интенсивностей соответствующих ионных токов.

В момент выхода компонентов из колонки измеряется полный ионный ток, суммируемый компьютером для каждого масс-спектра. Таким образом, суммированием ионных токов всех регистрируемых ионов в каждом масс-спектре и построением графика этой величины как функции номера масс-спектра (скана или время удерживания) формируется хроматограмма. Полученную хроматограмму обозначают как хроматограмму *по полному ионному току* (ПИТ, TIC, SCAN).

Хроматографический пик можно также построить через ионные токи отдельных ионов в масс-спектрах исследуемых веществ. Эти выходные кривые носят название ионных хроматограмм или масс-хроматограмм. Внешний вид хроматограммы может сильно измениться по сравнению с исходной хроматограммой, построенной по полному ионному току, поскольку все ионы, за исключением заданных, игнорируются. Преимущество этого метода состоит в том, что при продуманном выборе значений m/z ионов достигается селективность

при определении отдельных соединений или их определенных классов. Масс-хроматограмма молекулярных ионов компонентов очень важны при обнаружении этих веществ в сложных смесях. Анализ по масс-хроматограмме наиболее интенсивного иона в режиме полного ионного тока позволяет достигать наименьшего предела обнаружения исследуемого вещества, достигающего 10^{-12} г.

Селективное ионное детектирование (СИД, SIM). Селективное ионное детектирование используется для регистрации очень слабых ионных токов и понижения пределов обнаружения примесей хромато-масс-спектрометрическим методом. Увеличение чувствительности по сравнению со сканированием полного масс-спектра пропорционально отношению времени сканирования при настройке на один определенный ион к времени, которое приходится на регистрацию этого же иона при записи полного масс-спектра.

Еще одно преимущество SIM заключается в увеличении селективности определения, так как ионы со значениями m/z , отличающимися от выбранных, не детектируются. Поэтому, настройка масс-спектрометра на определенное значение m/z позволяет не регистрировать большинство загрязнений в газе-носителе и тем самым увеличивать соотношение: сигнал-шум. За счет обоих факторов выигрыш в чувствительности в методе SIM возрастает в 50-500 раз, в зависимости от типа прибора и числа регистрируемых ионов.

Преимущества хромато-масс-спектрометрии при проведении мониторинга объектов окружающей среды.

Достоинствами, выделяющими хромато-масс-спектрометрический метод, являются высокая селективность определения отдельных соединений или определенных классов соединений в сложной смеси и низкие пределы их обнаружения (до 10^{-12} — 10^{-10} г).

В некоторых случаях хромато-масс-спектрометрия является единственно возможным методом определения. В первую очередь это относится к группе особо опасных токсикантов — полихлорированных дибензо-*n*-диоксинов (ПХДД) и дибензофуранов (ПХДФ). Основным источником поступления ПХДД и ПХДФ в окружающую среду являются химические и металлургические производства, установки для сжигания бытовых и промышленных отходов и т. д. Эти супертоксиканты и, в частности, наиболее токсичный из них 2,3,7,8-тетрахлор-*n*-дибензодиоксин необходимо определять на уровне 10^{-10} % и ниже. С другой стороны существует 22 изомерных тетрахлорпроизводных ПХДД, среди которых, например, нужно выделить, идентифицировать и уметь определить только одно соединение. Сочетание таких двух сложных задач в состоянии разрешить только хромато-масс-спектрометрический метод.

2. ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа № 1. (для общего практикума).

Газохроматографическая идентификация ароматических углеводородов в растворе четыреххлористого углерода.

Цель работы: идентифицировать ароматические углеводороды в растворе четыреххлористого углерода с помощью газового хроматографа с пламенно-ионизационным детектированием.

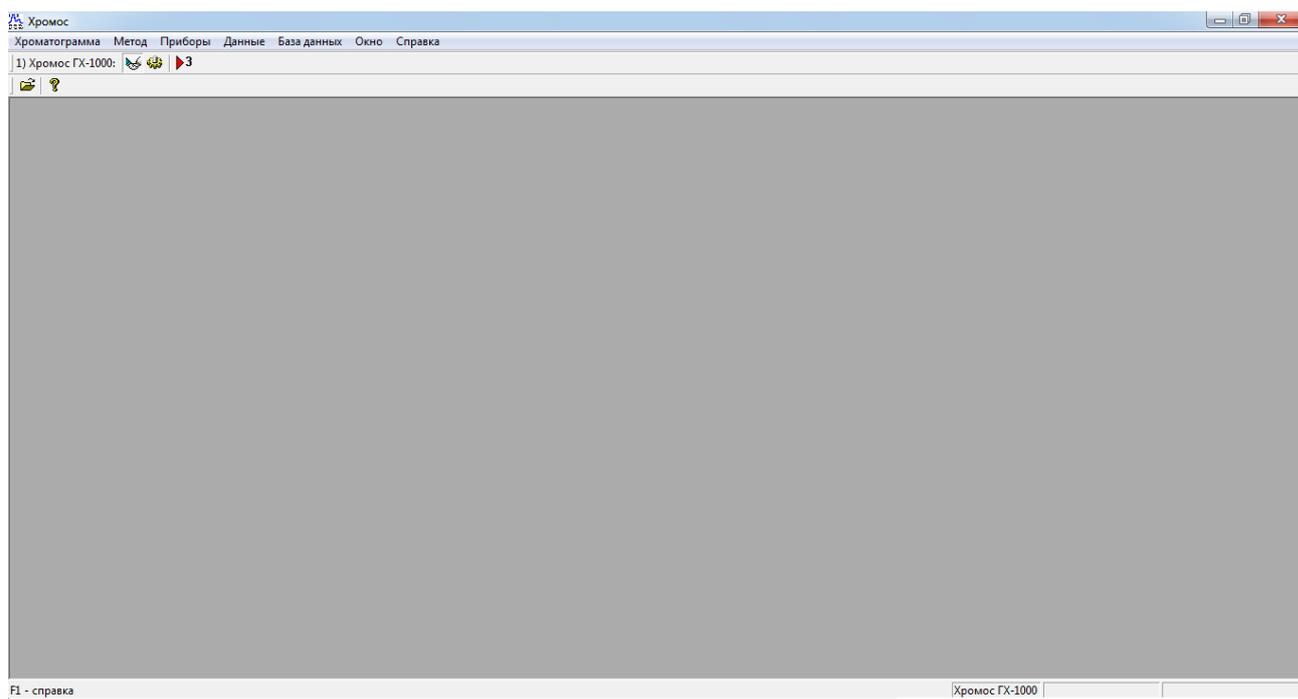
Ход работы:

Работа проводится на газовом хроматографе Хромос ГХ-1000 с пламенно-ионизационным детектором. Разделение примесей осуществляется на капиллярной колонке с неполярной неподвижной фазой (SE-54, BD-5MS или их аналоги). Для ввода пробы в испаритель хроматографа используется микрошприц МШ-10 или его аналог Hamilton.

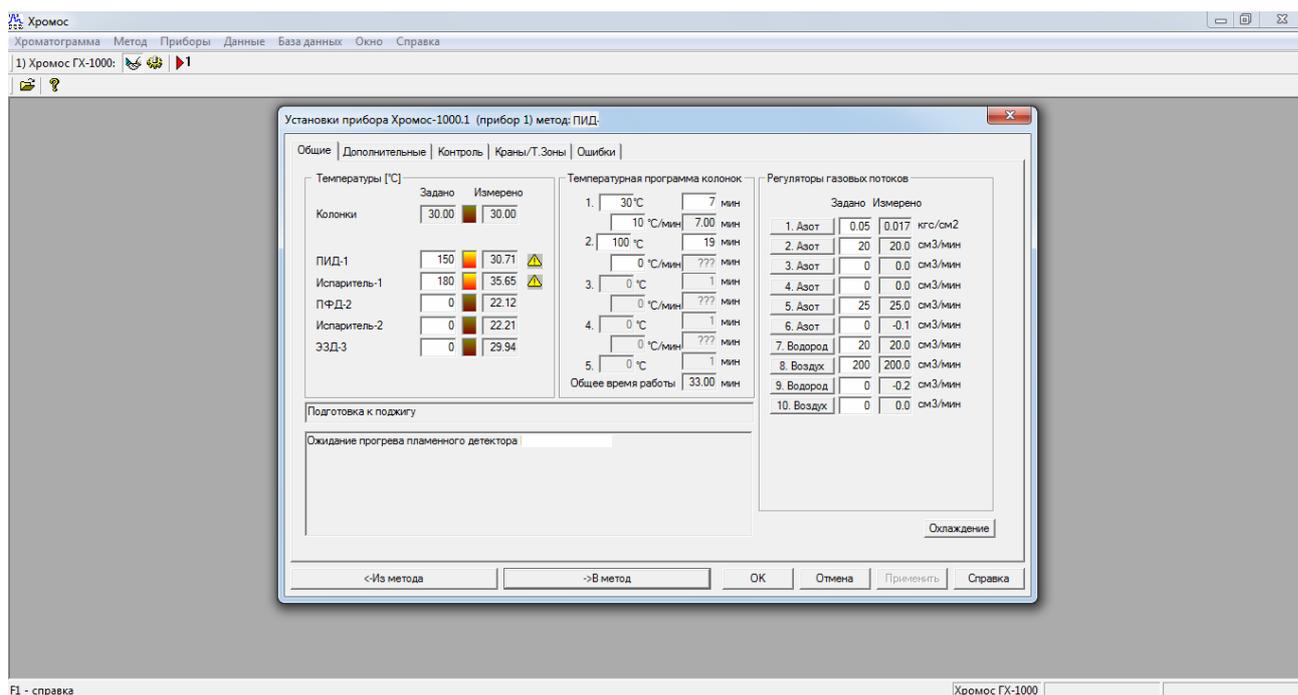
Проводят серию анализов растворов ароматических углеводородов в четыреххлористом углероде. Сначала анализируют раствор, содержащий бензол, затем – толуол, этибензол, *о,м,п*-ксилолы, псевдокумол. Определяют времена удерживания индивидуальных компонентов. Затем проводят анализ образца неизвестного состава (задачи) и идентифицируют содержащиеся в нем ароматические углеводороды по временам удерживания.

Работа проводится в среде программного обеспечения *Хромос 2.8*. При работе в среде Хромос используются две основные составляющие: метод и хроматограмма. Метод необходим для получения хроматограммы. В нём описаны режимы работы хроматографа. Хроматограмма включает в себя собственно график хроматограммы с разметкой пиков и, в случае если на хроматограмме присутствует разметка, таблицу пиков, в которой указаны времена выхода пиков, их высота, площадь, наличие репера, концентрация, единицы измерения и названия пиков.

При открытии программы появляется окно:

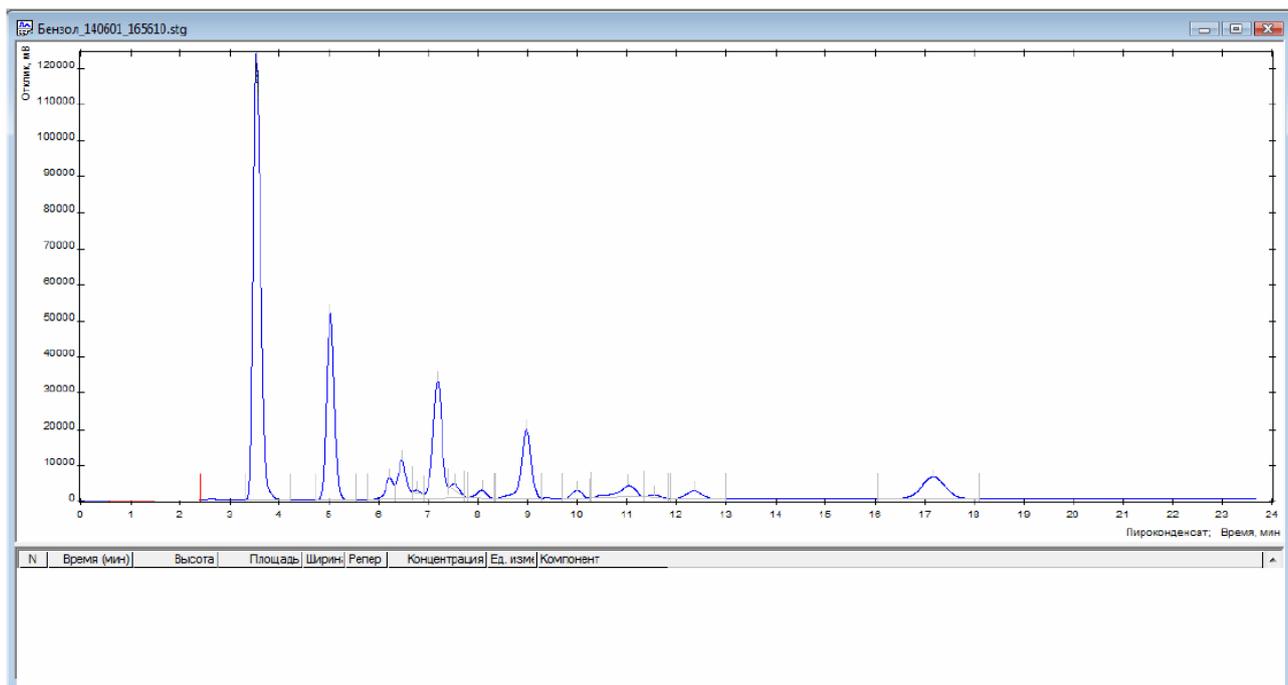


Далее, нажатием на кнопку , подключают программное обеспечение к прибору. Выбирают канал № 1 (ПИД): . Затем нажатием на кнопку  вызывают окно настройки параметров хроматографа. В нем задают температуру детектора 150°C, испарителя 180°C. Входное давление газа-носителя (азота) в колонку выставляют 0.05 кгс/см², расход водорода устанавливают 20 мл/мин, воздуха – 200 мл/мин.

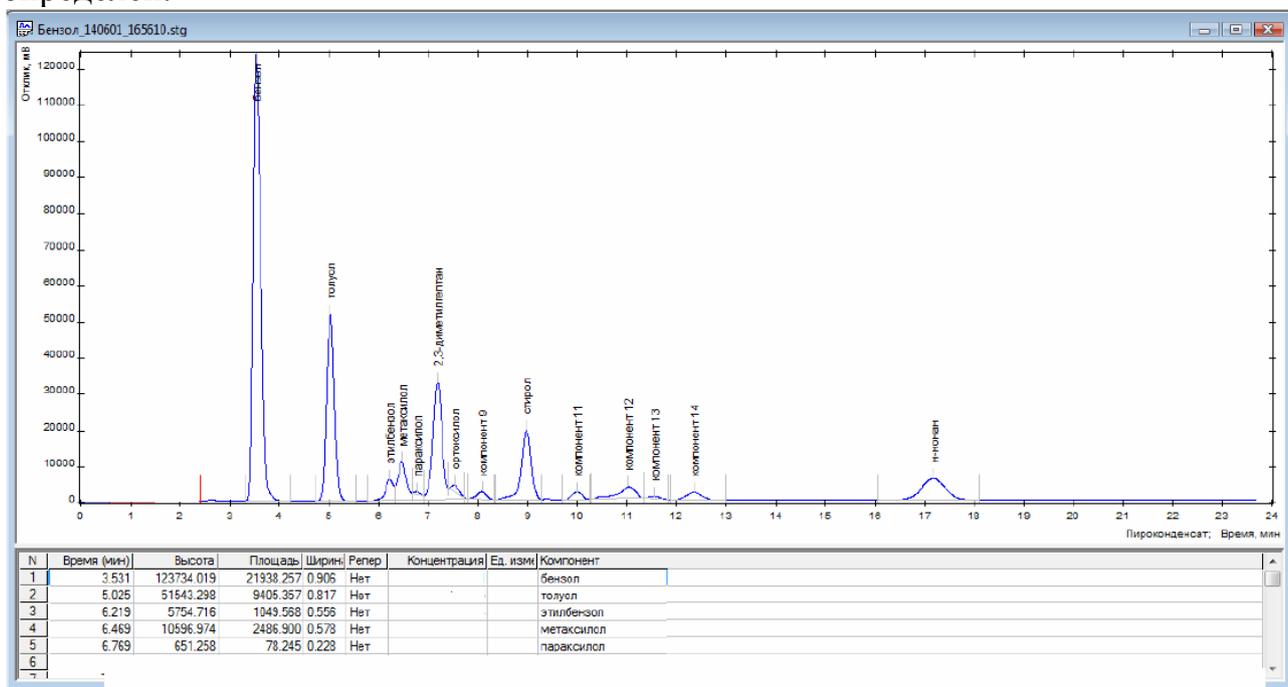


Затем нажимают кнопку \rightarrow *В метод* и сохраняют файл метода.

Для запуска анализа кнопкой *флажка канала* (кнопка запуска анализа по первому каналу ). При нажатии кнопки запуска анализа появляется окно выбора метода. Выбрав нужный метод, запускают подготовку прибора к анализу. Этот этап подготовки сопровождается выводом на экран окна *Запуск прибора*. Готовность прибора к анализу определяют по светодиоду *Готов* на панели прибора (загорается зеленым светом). Для ввода пробы используют микрошприц МШ-10 или его аналог *Hamilton*. Отбирают 1 мкл образца и, убедившись в отсутствии пузырьков в столбике жидкости шприца, вводят пробу в испаритель хроматографа быстрым аккуратным движением. Во время ввода пробы иглу микрошприца необходимо слегка придерживать во избежание ее деформации. В испаритель нужно погрузить всю длину иглы. Шток шприца опускают полностью, без усилия (чтобы не погнуть шток). Нажимают на кнопку начала анализа. Далее следят за элюированием веществ по текущей хроматограмме. Для этого открывают файл хроматограммы нажатием на кнопку . Появляется окно хроматограммы:



Для выделения хроматографического пика ставят курсор мыши на начало пика, нажимают правую кнопку и, не отпуская кнопки, ведут курсор к точке, где заканчивается пик. В этой точке отпускают кнопку. Хроматографический пик определен.



При определении пиков автоматически заполняется таблица. В ячейке *Компонент* необходимо вводить названия элюирующихся веществ.

Сначала проводят последовательный анализ растворов, содержащих индивидуальные компоненты, затем по временам удерживания определяют качественный состав смеси неизвестного состава.

Заполняют таблицу:

Таблица (образец). Результаты идентификации примесей в исследуемом образце.

<i>№ пика</i>	<i>Время удерживания, мин</i>	<i>Идентифицированное вещество</i>	<i>Ширина пика, мин</i>	<i>N, мм</i>	<i>N_{уд}, мм/м</i>
<i>1</i>	
<i>2</i>	

Эффективность N рассчитывают по формуле (27). $N_{уд}$ получают делением N на длину колонки.

Лабораторная работа № 2. (для общего практикума).

Газохроматографическое определение концентрации ароматических углеводородов в растворе четыреххлористого углерода.

Цель работы: определение методом абсолютной градуировки содержания ароматических углеводородов в растворе четыреххлористого углерода с помощью газового хроматографа с пламенно-ионизационным детектированием.

Ход работы:

Работа проводится на газовом хроматографе Хромос ГХ-1000 с пламенно-ионизационным детектором. Разделение примесей осуществляется на капиллярной колонке с неполярной неподвижной фазой (SE-54, BD-5MS или их аналоги). Для ввода пробы в испаритель хроматографа используется микрошприц МШ-10 или его аналог Hamilton.

Проводят анализ серии приготовленных растворов стандартных образцов ароматических углеводородов в четыреххлористом углероде. Измеряют площади пиков.

Составляют таблицу:

Таблица (образец). Результаты измерения площади хроматографических пиков примесей.

<i>№ пика</i>	<i>Время удерживания</i>	<i>Примесь</i>	<i>Площадь пика</i>	<i>Концентрация вещества, масс. %</i>
<i>1</i>	
<i>2</i>	

Затем строят график в MS Excel в логарифмических координатах $\lg S - \lg C$. Добавляют линию тренда (линейный вариант). По уравнению линии тренда находят концентрацию C_x примесей в исследуемом образце.

Лабораторная работа № 3 (для общего практикума).

Определение содержания ароматических углеводородов в воде с помощью жидкостной экстракции.

Цель работы:

1. Провести экстракционное извлечение ароматических углеводородов из образца воды.
2. Определить концентрацию примесей в полученном экстракте и оценить содержание примесей с помощью газовой хроматографии.

Ход работы:

Работа проводится на газовом хроматографе Хромос ГХ-1000 с пламенно-ионизационным детектором. Разделение примесей осуществляется на капиллярной колонке с неполярной неподвижной фазой (SE-54, BD-5MS или их аналоги). Для ввода пробы в испаритель хроматографа используется микрошприц МШ-10 или его аналог Hamilton. В качестве экстрагента используется четыреххлористый углерод марки ОСЧ-18-4, дополнительно очищенный ректификацией.

На электронных весах Shimadzu AW-220 первого класса точности проводят взвешивание пустой виалы, в которой будет проводиться экстракция. Затем в виалу приливают 1 мл анализируемой воды. Проводят взвешивание виалы с водой. Массу воды устанавливают по разности масс виалы с водой и пустой виалы. Затем приливают 1 мл четыреххлористого углерода. Проводят взвешивание заполненной виалы. Находят массу экстрагента. Далее плотно закрывают виалу крышкой и в течение 15 минут перемешивают жидкости энергичным встряхиванием. После прекращения перемешивания необходимо подождать расслоения жидкостей. Отбирают из органической фазы (нижний слой) 1 мкл экстракта и вводят в испаритель хроматографа. Расчет концентрации примесей (в масс. %) в четыреххлористом углероде проводят по градуировочным зависимостям, построенным при выполнении предыдущей работы.

В расчете содержания ароматических углеводородов в воде учитывают плотность четыреххлористого углерода. При расчетах сделать допущение, что примеси полностью перешли в экстрагент из водной фазы.⁴

Составляют таблицу:

⁴ В эколого-аналитическом мониторинге для повышения правильности анализа воды предварительно устанавливают степень извлечения аналита из матрицы. При расчете концентрации примеси в водном растворе учитывают эту величину.

Таблица (образец). Результаты определения концентрации примесей в воде.

<i>Вещество</i>	<i>Время удерживания</i>	<i>Концентрация в экстракте, масс %</i>	<i>Концентрация в воде, в масс %</i>	<i>Концентрация в воде, в мг/л</i>
...		
...		

Лабораторная работа № 4 (для спецпрактикума).

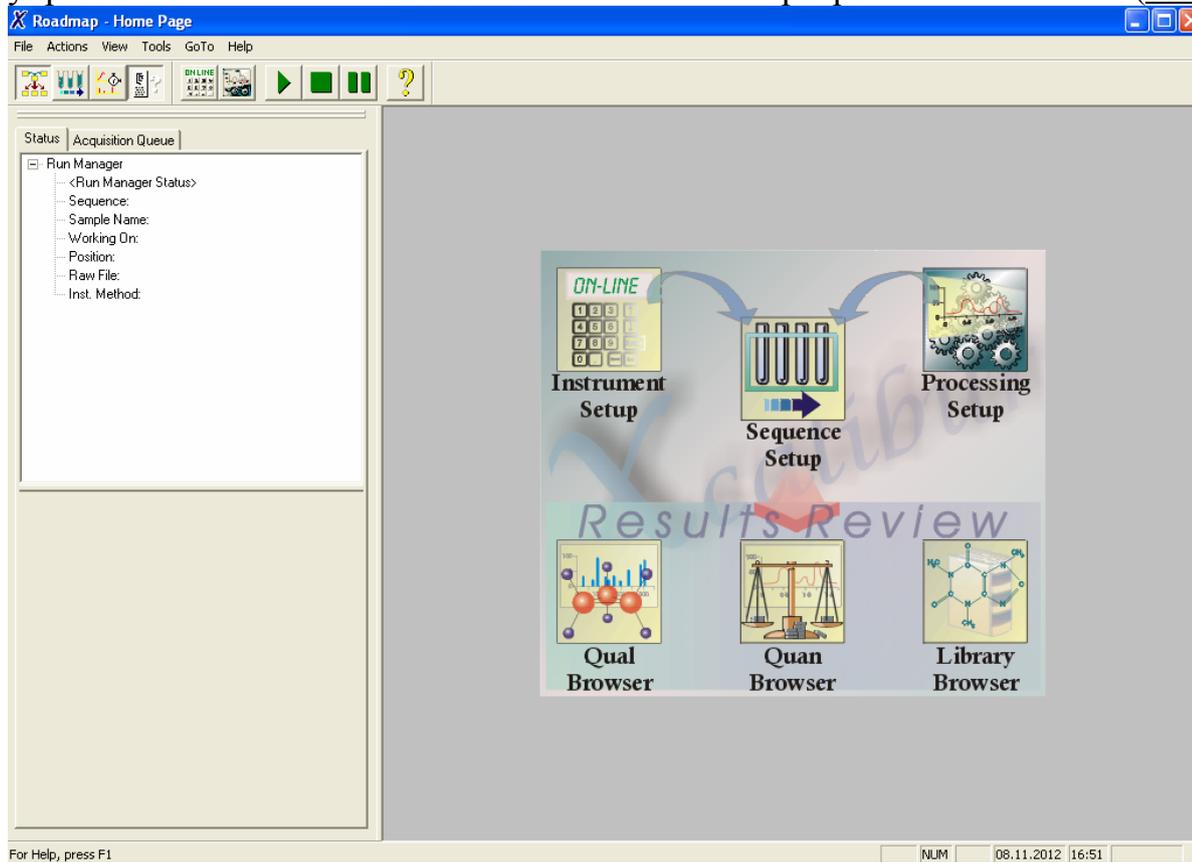
Хромато-масс-спектрометрическая идентификация галогенсодержащих и ароматических примесей в растворе четыреххлористого углерода.

Цель работы: Провести идентификацию компонентов смеси по масс-спектрам при сканировании в режиме полного ионного тока (SCAN) и создать файл метода для работы в режиме селективного ионного мониторинга (SIM).

Ход работы:

Работа проводится на хромато-масс-спектрометре ThermoFinnigan Focus DSQ II с квадрупольным масс-анализатором. Разделение примесей осуществляется на капиллярной колонке с неполярной неподвижной фазой (SE-54, BD-5MS или их аналоги). Предел обнаружения примесей на данном приборе в режиме полного ионного тока составляет 10^{-6} % (масс.).

Управление хромато-масс-спектрометром осуществляется с помощью программного обеспечения X-Calibur. После открытия X-Calibur появляется окно управления элементами программы (*Roadmap*):



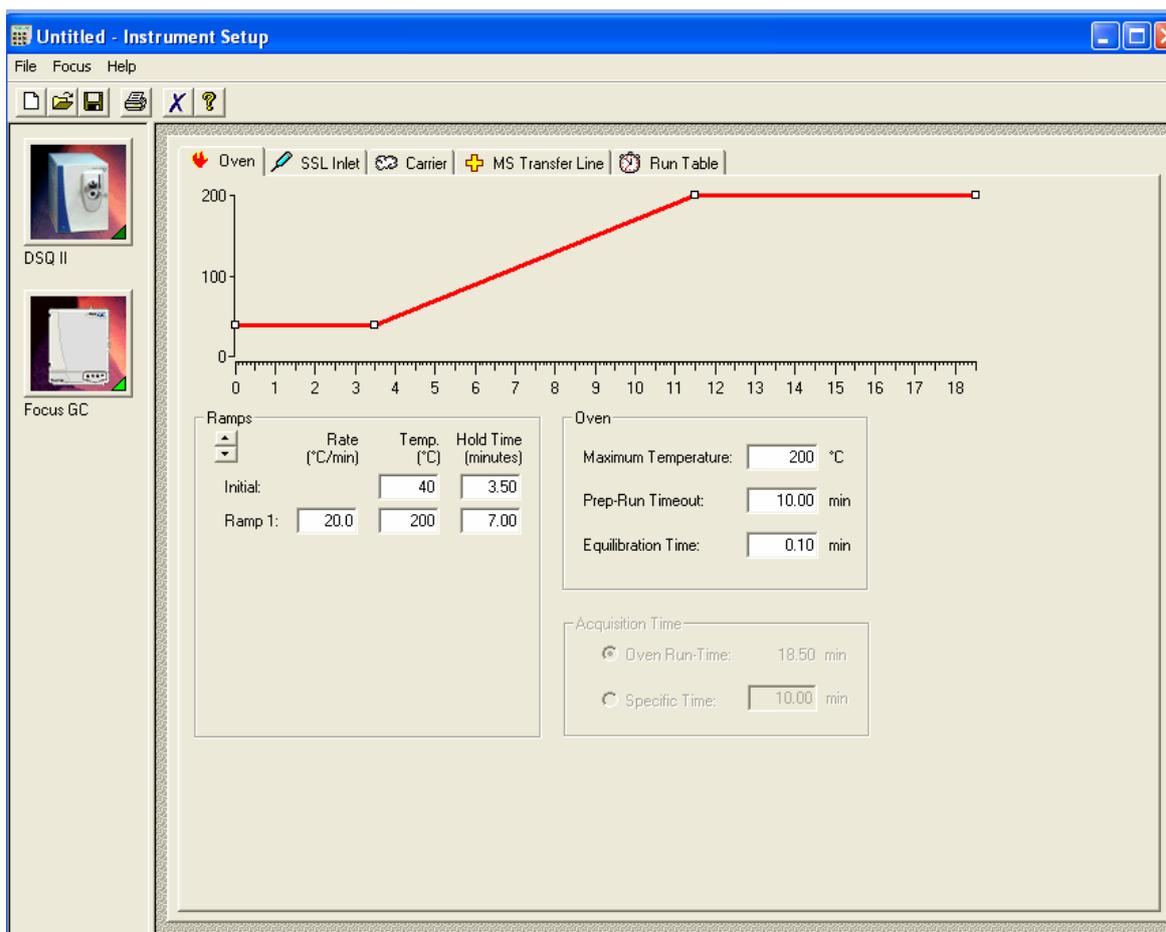
Для начала работы необходимо создать *файл метода*. Он представляет собой совокупность рабочих параметров прибора, которые будут использоваться хромато-масс-спектрометром во время анализа. Для создания файла метода необходимо нажать на иконку *Instrument Setup*. Появится окно создания файла метода:

Для управления параметрами масс-детектора необходимо нажать на иконку DSQ II:

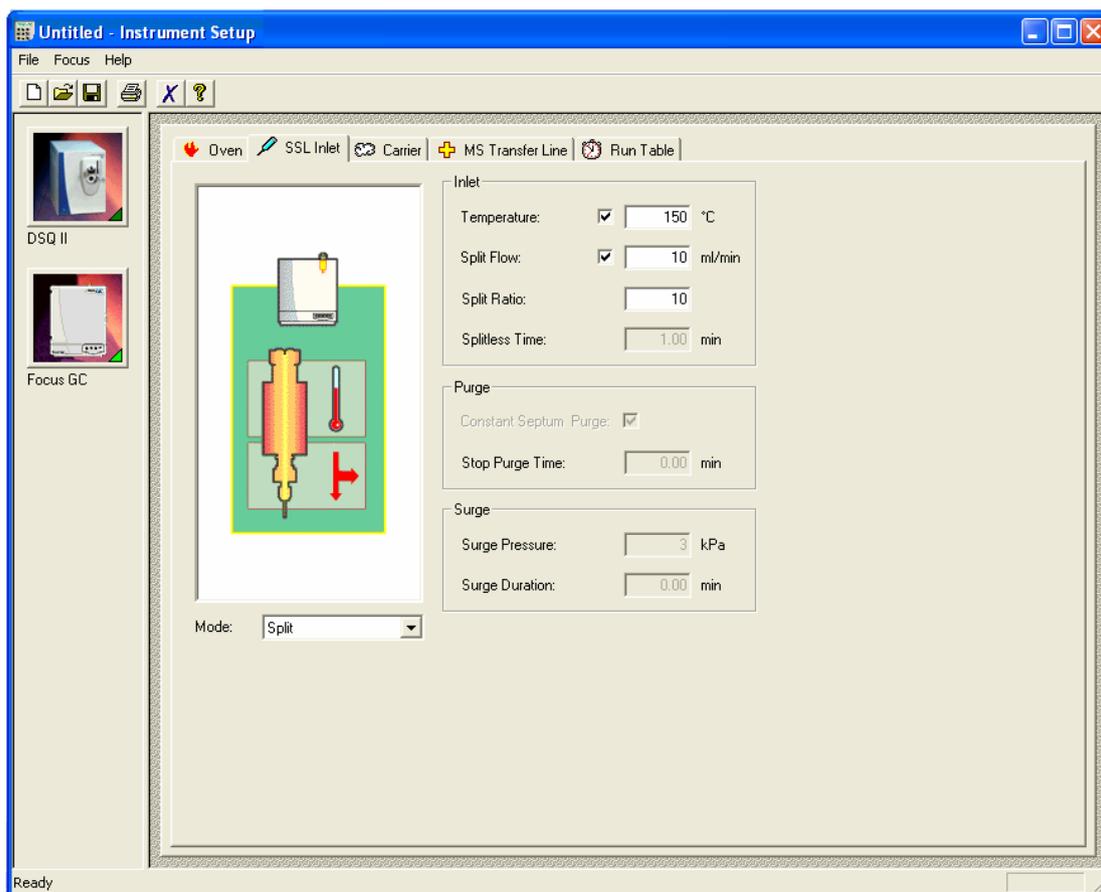
В появившемся окне необходимо задать температуру детектора 200°C (строка Ion Source). Затем задается время начала сканирования (работы детектора) с момента ввода пробы. Для этого в строке Start time (min) задается время 5 мин (при использовании четыреххлористого углерода в качестве основного компонента). Для задания диапазона сканирования масс необходимо во вкладке Scan 1 выбран режим полного ионного тока нажатием на строку Full Scan. Затем нажатием на кнопку Parameters выбираем диапазон сканирования масс: 50-200 Да. Остальные масс-спектрометрические параметры оставить без изменения (заряд регистрируемых ионов Ion Positive, коэффициент усиления сигнала на электронном умножителе Detector gain, время одного скана Scan time, совокупность автонастроек Autotune).

Для управления параметрами хроматографа необходимо нажать на иконку Focus GC.

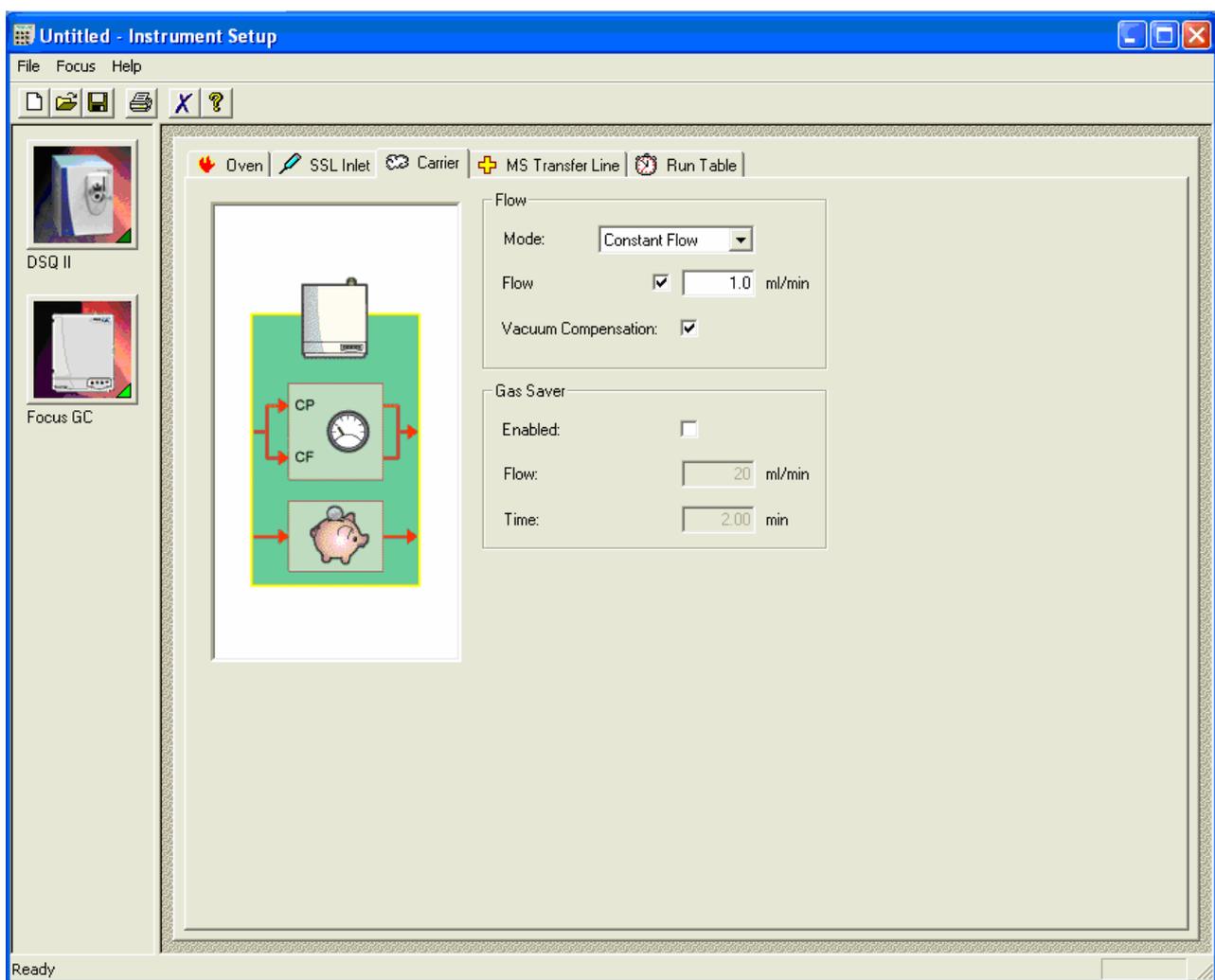
В появившемся окне необходимо задать программирование температуры термостата колонки. Для этого во вкладке Oven задается начальная температура (Initial) 40°C и время выдержки начальной температуры Hold Time 4 мин. Затем выставляется программирование температуры Ramp1 20 °C/мин и конечная температура колонки 200 °C, а также время выдержки конечной температуры Hold Time 7 мин.



Во вкладке SSL Inlet задается температура испарителя и расход газаносителя: в строке Temperature вводится значение 200°C, задается режим – с делением потока газаносителя, - выбирается в строке Mode режим Split. Далее задается величина «сброса» - потока, который удаляется из испарителя, минуя хроматографическую колонку. Для этого в строке Split Flow выставляется значение 10 мл/мин.



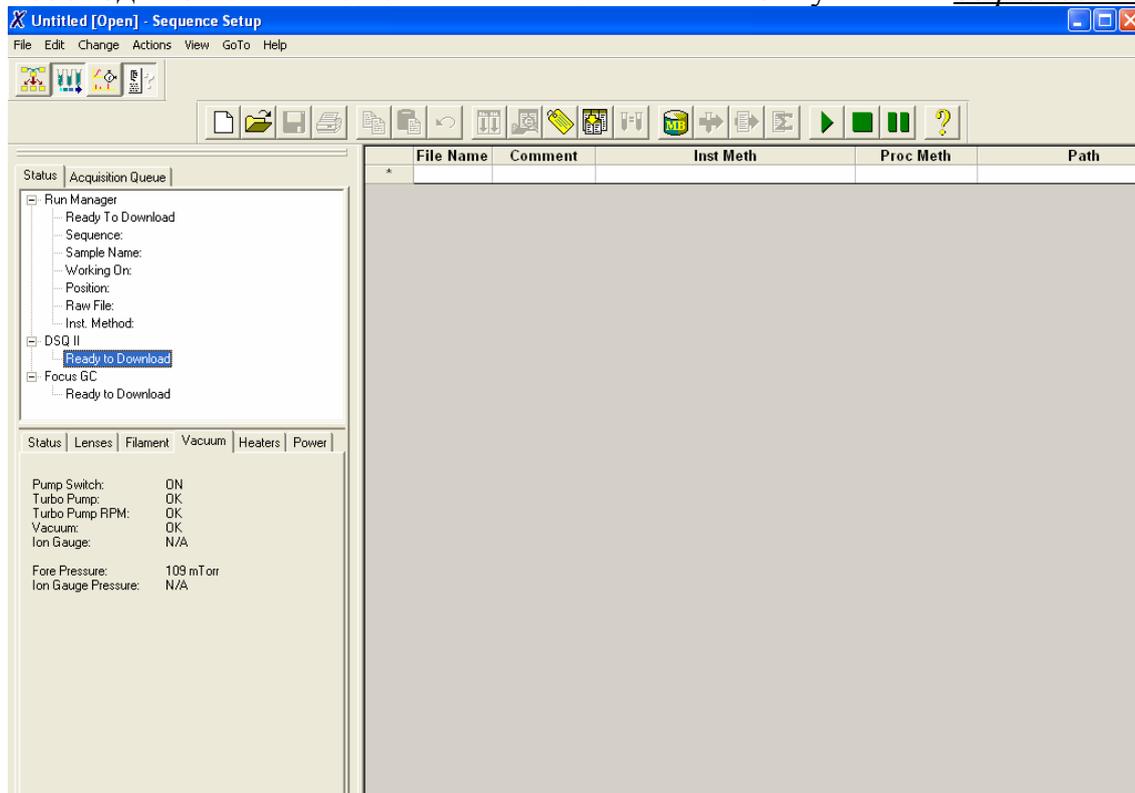
Во вкладке *Carrier* производится задание необходимо потока газа-носителя через колонку. Необходимо в строке *Mode* выбрать в качестве параметра постоянный поток – *Constant Flow*. Затем в строке *Flow* необходимо задать значение потока через колонку 1 мл/мин. Далее нужно включить флажок *Vacuum Compensation*, что означает перевод параметров хроматографа в режим компенсации (учета) вакуума в масс-детекторе.



Во вкладке *MS Transferline* задается температура переходной камеры, соединяющей хроматограф и масс-детектор. Необходимо выставить температуру 250°C.

Файл метода сохраняют. При сохранении в окне *Comments* оставить информацию: номер группы, название работы.

Для подготовки к записи хроматограммы и проведения анализа необходимо нажать на иконку Sequence Setup:



В появившейся строке вводим параметры записи хроматограммы: в ячейке File Name – в печатываем название будущей хроматограммы (название работы, номер группы). Для ввода названия необходимо нажать клавишу F2. Все символы должны быть введены латиницей, вместо пробела использовать символ подчеркивания. В ячейке Inst Meth выбирается файл метода, данные которого будут использованы в качестве параметров проведения анализа. Для этого нажатием на ячейку правой кнопкой мыши вызывается контекстное меню, в котором необходимо нажать на строку Browse. Затем в появившемся окне выбрать созданный файл метода. В ячейке Path задать путь сохранения хроматограммы.

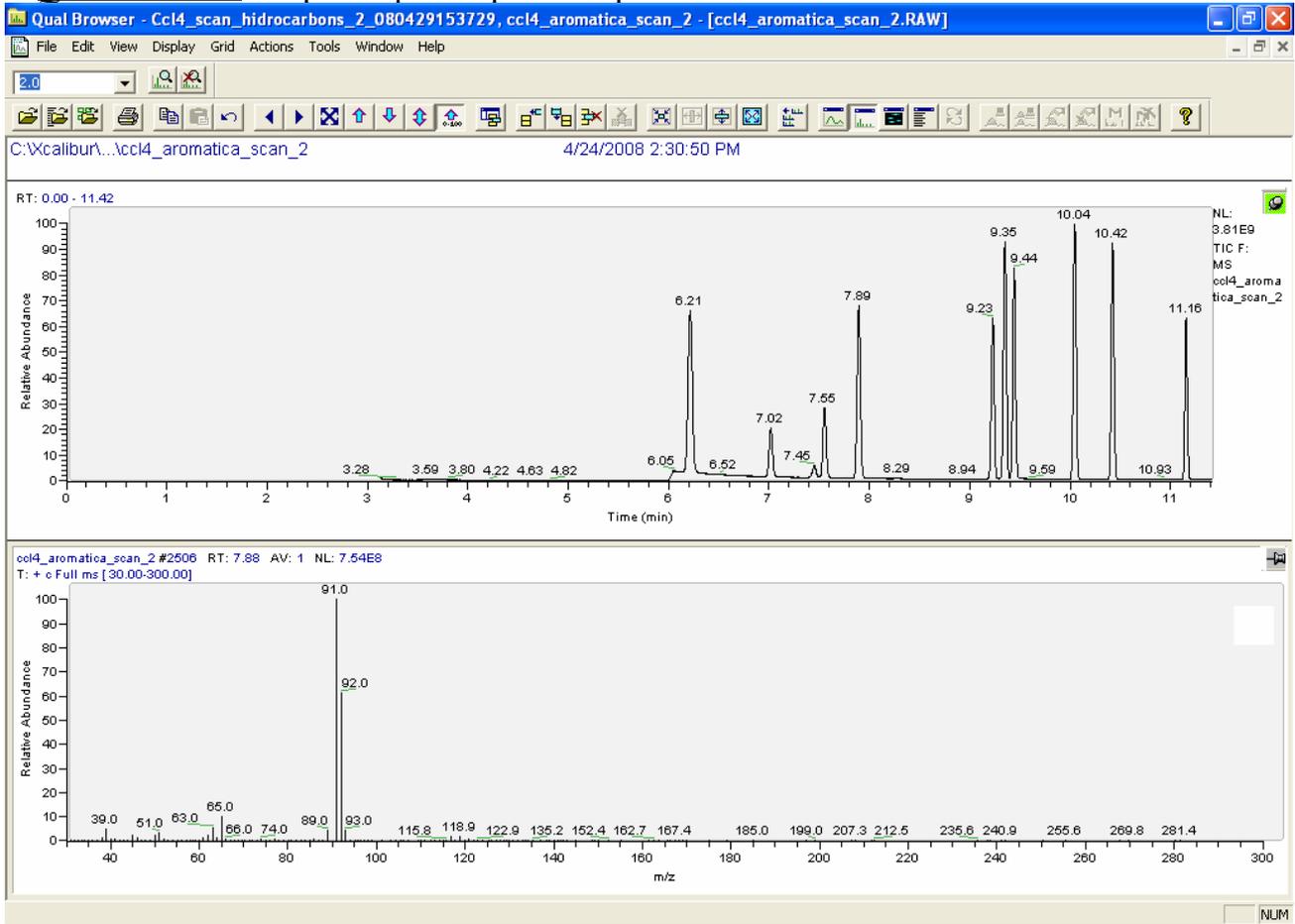
Для установки хромато-масс-спектрометром необходимых для анализа параметров, заданных в файле метода, нажать на кнопку Run Sample. Соответствие текущих и заданных параметров можно контролировать следующим образом. В окне Sequence Setup во вкладке Status выбрать: Focus GC → Values (параметры хроматографа) или DSQ II (параметры масс-детектора). Когда прибор будет готов к вводу пробы, в статусе строк Focus GC и DSQ II появится надпись «*Waiting for contact*», а на корпусе хроматографа загорается лампочка «*REDY TO INJECT*». Перед вводом пробы в окне Sequence Setup нажатием на кнопку Keypad вызывают виртуальную панель управления.

Для ввода пробы используется микрошприц на 10 мкл (МШ-1 или его аналог Hamilton). Отобрать 1 мкл приготовленного раствора и ввести в испаритель хроматографа. Сразу после ввода быстро нажать на кнопку Start виртуальной

панели управления. Начался анализ. Для просмотра хроматограммы в режиме реального времени нажать на кнопку *Real Time Plot*.

Просматривать хроматограммы в режиме on-line можно также в программе *Qual Browser*. Вход в данную программную среду осуществляется с помощью окна *Roadmap* нажатием на кнопку *Qual Browser*.

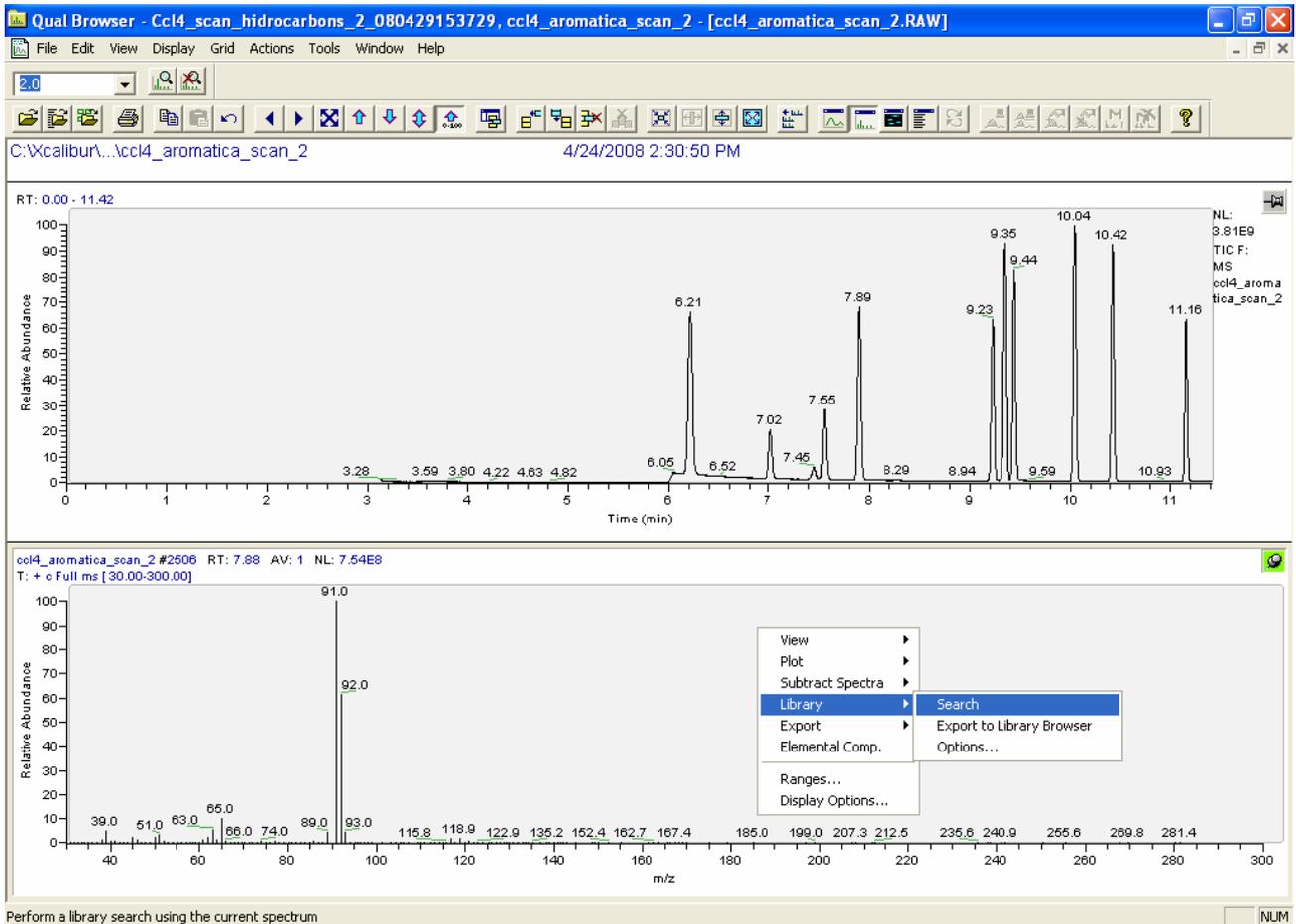
В *Qual Browser* открыть файл хроматограммы:



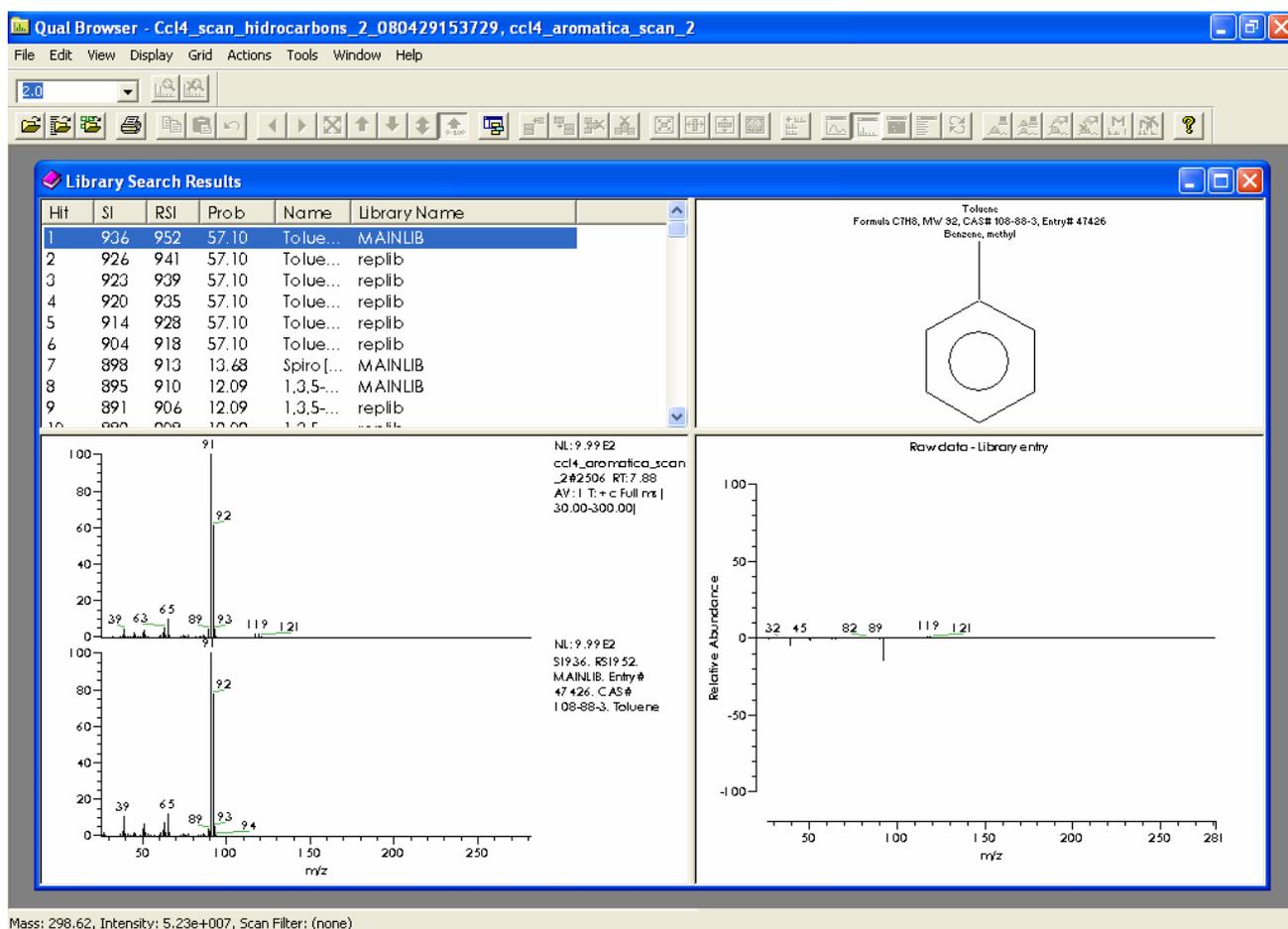
В появившемся окне две области: верхняя - область хроматограммы, нижняя - область масс-спектра. Одновременно активной может быть только одна область. Активная область имеет значок  в верхнем правом углу, неактивная - . Для работы с нужной областью ее необходимо активировать одним нажатием левой клавиши мыши на значок. Тогда значок  становится , это значит, что область стала активной и в ней можно работать.

Каждой точке хроматограммы соответствует свой масс-спектр. Для правильного определения масс-спектра необходимо привести курсор на максимум хроматографического и нажать на левую клавишу мыши (при этом области хроматограммы должна быть активна). В нижней области появится масс-спектр данного соединения (например, толуола, как показано выше). Для того чтобы идентифицировать вещество, имеющее данный масс-спектр, необходимо

активировать нижнюю область. Затем, нажатием правой кнопки мыши, вызвать контекстное меню:



В контекстном меню выбрать Library (библиотека масс-спектров) → Search (поиск совпадающего масс-спектра). Нажать один раз левой кнопки мыши. Компьютер начинает сравнение полученного масс-спектра неизвестного компонента с масс-спектром электронной базы данных NIST. Операция длится 3-6 сек. Затем программа выводит результаты идентификации:



Mass: 298.62, Intensity: 5.23e+007, Scan Filter: (none)

В появившемся окне выводится название и структурная формула идентифицированного соединения, а также сравнение полученного масс-спектра (сверху) и масс-спектра базы данных (снизу). Вероятность совпадения масс-спектров (в %) дана в столбце *Prob* (в данном примере 57,10 %).

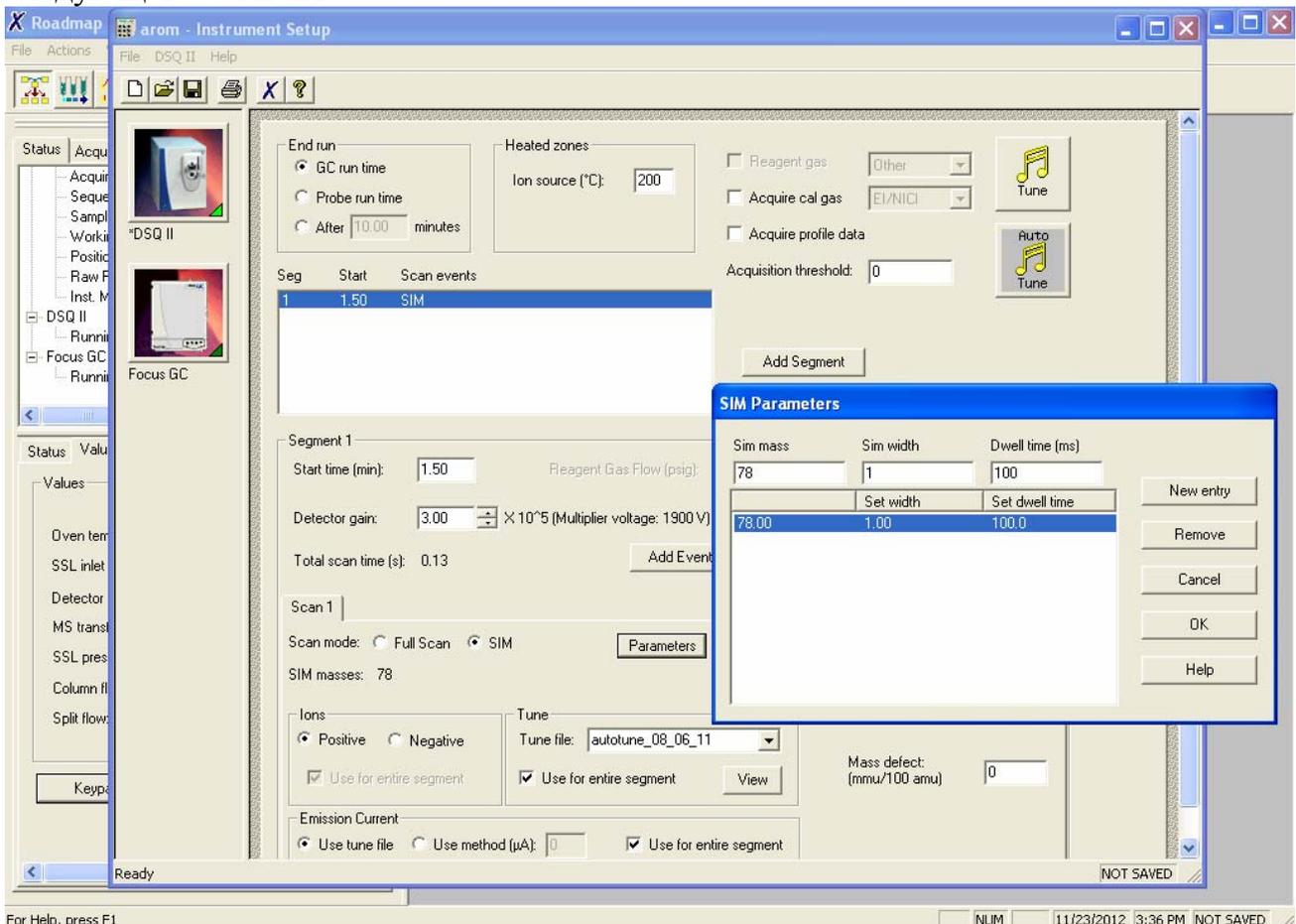
Таким образом проводят идентификацию всех интенсивных хроматографических пиков данного образца.

Заполнить таблицу:

Таблица (образец). Результаты идентификации примесей в исследуемом образце.

№ пика	Время удерживания	Идентифицированное вещество	Наиболее интенсивные линии в масс-спектре (2-3 линии)	Вероятность совпадения масс-спектров
1
2

После заполнения таблицы необходимо создать файл метод для записи хроматограмм в режиме SIM (селективного ионного детектирования). Все параметры метода задаются такими же, как и при создании метода SCAN, только необходимо предварительно разбить время сканирования на сегменты. Для этого во вкладке с заданием сегментов нужно использовать кнопку *Add Segment*. Каждое нажатие на кнопку создает новый сегмент. Время начала сегмента задается в строке *Start time (min)*. Конец сегмента автоматически задается началом последующего сегмента. Временной интервал сегмента выбирается таким образом, чтобы примесь элюировалась в течение данного интервала. Режим SIM отличается от режима SCAN тем, что сканирование масс-спектра осуществляется по 1-3 наиболее интенсивным линиям спектра. Для задания m/z , которые будут регистрироваться, необходимо во вкладке *Scan* выбрать *SIM*, нажать *Parameters*. В появившемся окне в ячейке *Sim mass* необходимо поочередно вводить наиболее интенсивные линии масс-спектра (с наибольшим значением m/z). Для ввода используется кнопка *New entry*. Когда значения m/z для данного диапазона сканирования будут введены, нажать *OK* и приступить к вводу m/z для следующего сегмента.



После задания всех параметров метода необходимо сохранить файл метода.

Лабораторная работа № 5 (для спецпрактикума).

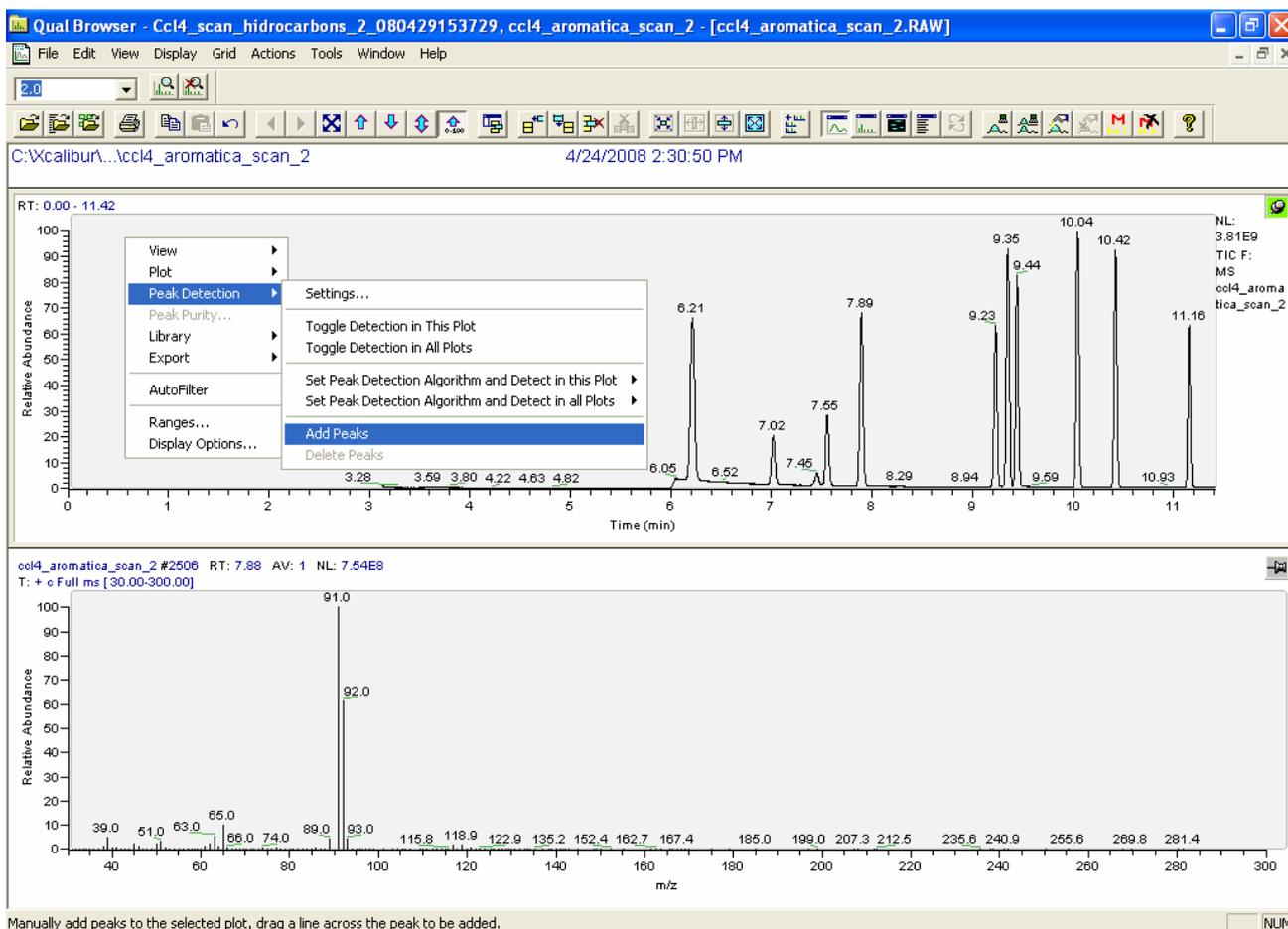
Хромато-масс-спектрометрическое определение концентрации галогенсодержащих и ароматических примесей в растворе четыреххлористого углерода.

Цель работы: методом абсолютной градуировки определить содержание галогенсодержащих и ароматических примесей в растворе четыреххлористого углерода.

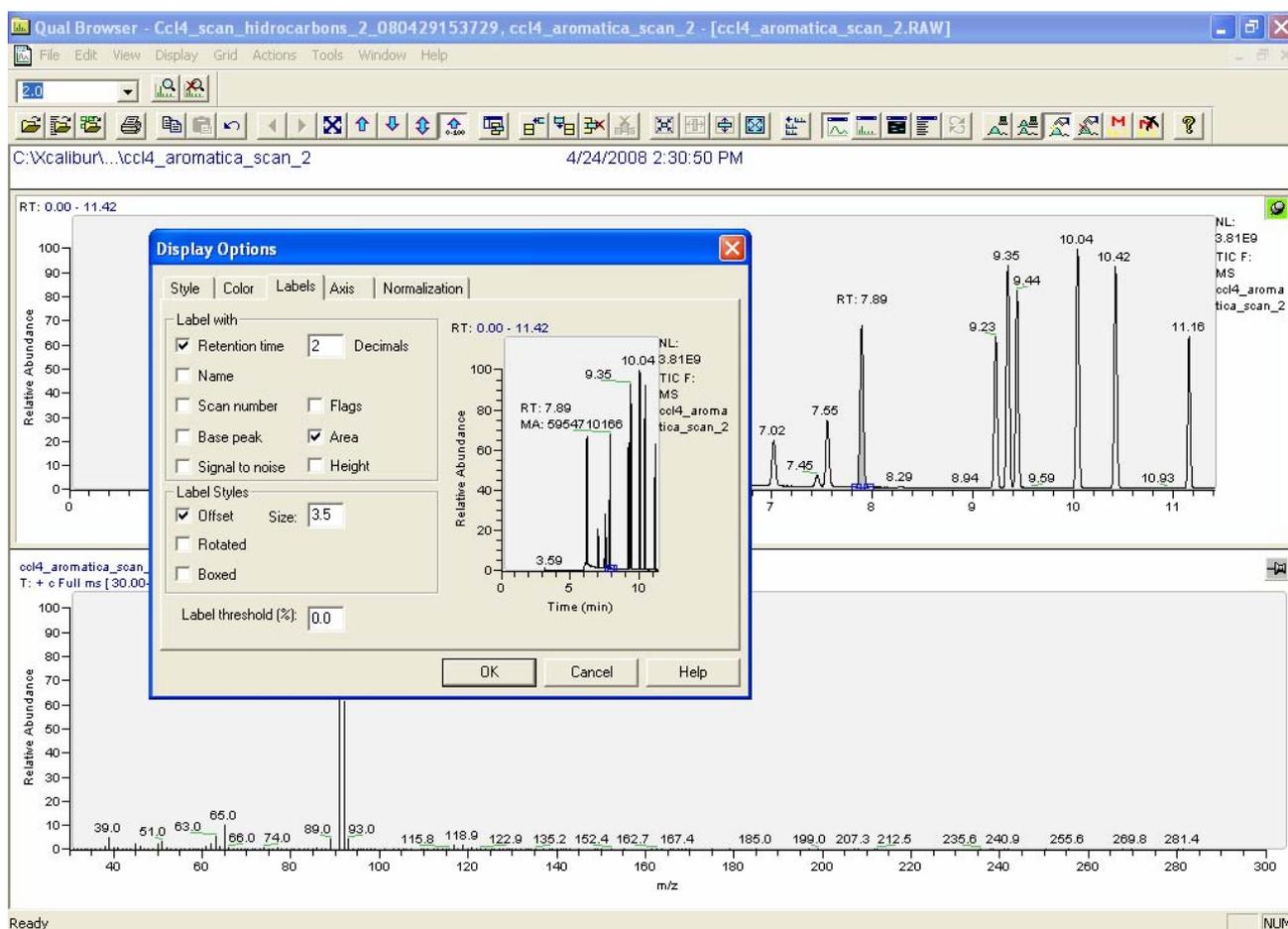
Ход работы:

Работа проводится на хромато-масс-спектрометре ThermoFinnigan Focus DSQ II с квадрупольным масс-анализатором. Разделение примесей осуществляется на капиллярной колонке с неполярной неподвижной фазой (SE-54, BD-5MS или их аналоги).

Сначала проводят анализ образца в режиме полного ионного тока (см. описание выше, работа № 4). Затем создают файл метода для сканирования в режиме SIM. Далее проводят анализ образца в режиме селективного ионного мониторинга. Измеряют площади хроматографических пиков. Для выделения пиков активируют область хроматограммы. Затем нажатием правой клавиши мыши вызывают контекстное меню и в нем выбирают *Peak Detection (определение пика)*, затем выбирают *Add Peaks* (добавить пики).



Курсор стал выделителем пика. Курсор ставят на начальный участок пика, нажимают левую кнопку мыши и ведут, не отпуская кнопку, к концу пика, где отпускают кнопку. Пик обозначен. Теперь необходимо, чтобы программа выдала значения площади пика. Для этого правой кнопкой мыши вызывают контекстное меню и в нем выбирают *Display Options*. В появившемся окне выбрать вкладку *Labels* (надписи). Во вкладке выбрать *Area* (площадь) – должна появиться галочка напротив слова.



На хроматограмме вместе со значениями времен удерживания появились значения площадей пиков.

Далее анализируют приготовленные из стандарта градуировочные образцы.

Составляют таблицу:

Таблица (образец). Результаты измерения площади хроматографических пиков примесей.

№ пика	Время удерживания	Примесь	Площадь пика	Концентрация вещества, масс. %
1	
2	

Затем строят график в MS Excel в логарифмических координатах $\lg S - \lg C$. Добавляют линию тренда (линейный вариант). По уравнению линии тренда находят концентрацию C_x примесей в исследуемом образце.

Лабораторная работа № 6 (для спецпрактикума).

Анализ воды с помощью жидкофазного микроэкстракционного концентрирования с диспергированием экстрагента.

Цель работы:

1. Провести микроэкстракционное концентрирование ароматических и хлорорганических примесей из образца воды с применением диспергатора.
2. Определить концентрацию примесей в полученном экстракте с помощью газовой хроматографии с масс-спектрометрическим/пламенно-ионизационным детектированием.

Ход работы:

Работу проводят на хромато-масс-спектрометре ThermoFinnigan Focus DSQ II или газовом хроматографе Хромос ГХ-1000 с пламенно-ионизационным детектором. Для разделения примесей используют капиллярную колонку DB-5ms с неподвижной полидиметил(95%)фенил(5%)силоксановой фазой.

Для диспергирования готовят 1.5 об. % раствор четыреххлористого углерода марки ОСЧ-18-4 в этиловом спирте (вещество-диспергатор). При приготовлении раствора используют электронные весы Shimadzu AW-220 первого класса точности. В коническую пробирку для диспергирования (см. рис. 18) помещают 6 мл анализируемого раствора (1). Затем шприцем в пробирку вносили 1 мл диспергатора, содержащего четыреххлористый углерод (2). Агрегирование частиц эмульсии в отдельную фазу осуществляют центрифугированием. Для этого используют центрифугу ОПН-8 на скорости вращения ротора 6000 об/мин в течение 3 минут. Далее в микрошприц МШ-10 (ТУ 2.833.106) отбирают аликвоту экстракта в количестве 1 мкл и вводят ее в испаритель хроматограф (4).

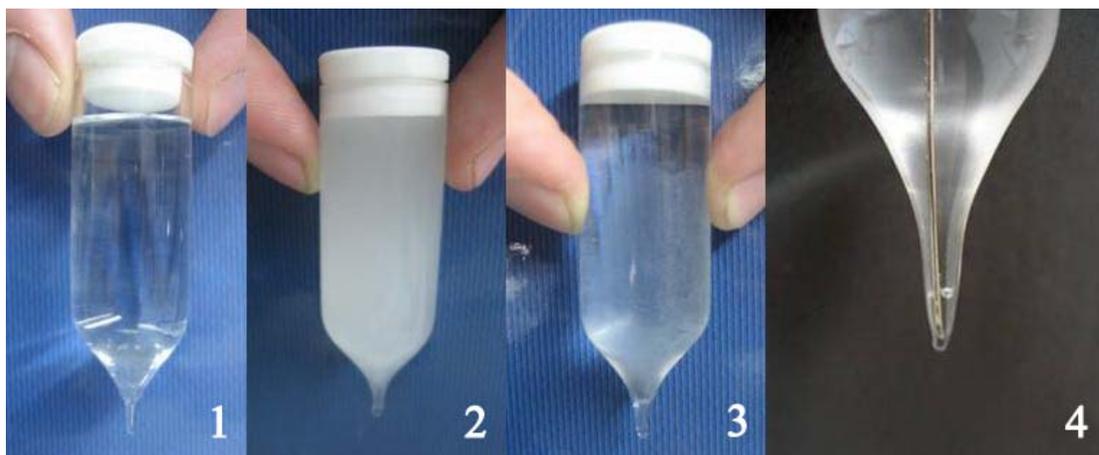


Рис. 18. Стадии проведения микроэкстракции.

Проводят анализ экстракта и методом абсолютной градуировки определяют концентрацию примесей в экстракте. Концентрацию C_x примесей в воде находят по формуле:

$$C_x = \frac{C_{extr}}{K_{кон}}, \quad (59)$$

где C_{extr} – концентрация примесей в экстракте,
 $K_{кон}$ – коэффициент концентрирования примесей из воды в экстракт.

Составляют таблицу:

Таблица (образец). Результаты определения концентрации примесей в воде.

<i>Вещество</i>	<i>Время удерживания</i>	<i>Концентрация в экстракте, масс %</i>	<i>Концентрация в воде, в масс %</i>	<i>Концентрация в воде, в мг/л</i>
...		
...		

Список литературы

1. Коренман И.М. Экстракция в анализе органических веществ. М.: Химия, 1977. 200 с.
2. Крылов В. А., Крылов А. В. Микроэкстракционное концентрирование токсикантов. Хромато-масс-спектрометрическое определение высокотоксичных ароматических и хлорсодержащих углеводородов в воде. Lambert Academic Publishing. 2011. 140 с.
3. Крылов В.А., Крылов А.В., Мосягин П.В., Маткивская Ю.О. Жидкофазное микроэкстракционное концентрирование примесей // Журнал аналитической химии. 2011. Т.66, № 4. С. 341 – 360.
4. Крылов А. В. Хромато-масс-спектрометрическое определение примесей в воде с микроэкстракционным концентрированием: дис...канд. хим. наук. Н. Новгород, 2011. 126 с.
5. Основы аналитической химии / под ред. Ю.А. Золотова. М.: Высшая школа, 2000. 460 с.
6. Бражников В.В. Дифференциальные детекторы для газовой хроматографии. М.: Наука, 1974. 233 с.
7. Руденко Б.А., Руденко Г.И. Высокоэффективные хроматографические процессы. Том. 1. Газовая хроматография. М.: Наука, 2003. 425 с.
8. Руководство по газовой хроматографии. Ч. 1. Под ред. Лейбница Э., Штруппе Х.Г. М.: Мир, 1988. 480 с.
9. Крылов В.А. Хромато-масс-спектрометрический метод анализа. Н.Новгород: ННГУ, 2004. 55 с.
10. Лебедев А.Т. Масс-спектрометрия в органической химии. М.: Бинوم, 2003. 834с.
11. Майстренко В.Н., Ключев Н.А. Эколого-аналитический мониторинг стойких органических загрязнителей. М.: БИНОМ, 2004. 323 с.
12. Майстренко В.Н., Хамитов Р.З., Будников Г.К. Эколого-аналитический мониторинг супертоксикантов. М.: Химия, 1996. 319 с.
13. Другов Ю.С., Родин А.А. Газохроматографическая идентификация загрязнений воздуха, воды и почвы. С.-Пб.: Теза, 1999. 623с
14. Сониясси, Р. Анализ воды: органические микропримеси. Практическое руководство / Р. Сониясси, П. Сандра, К. Шлет. - СПб: Теза, 2000. 248 с.
15. Вяхирев Д. А. Руководство по газовой хроматографии / Д.А. Вяхирев, А.Ф. Шушунова. М.: Высшая школа, 1975. 373 с.
16. Винарский В.А. Хроматография: Курс лекций в двух частях: Часть 1. Газовая хроматография. Минск.: Научно-методический центр “Электронная книга БГУ”, 2003. 192 с.
17. ГОСТ Р 51592-2000. Вода. Общие требования к отбору проб. М., 2005. 32 с.
18. Фридман А. Э. Основы метрологии. Современный курс. С.-Пб.: НПО «Профессионал», 2008. 284 с.

**ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ
ТОКСИКАНТОВ В ВОДЕ**

Павел Валерьевич Мосягин
Валентин Алексеевич Крылов

Электронное учебно-методическое пособие

Государственное образовательное учреждение высшего
профессионального образования "Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского"
603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23.