

**Introduction
to Microscale
High-Performance
Liquid Chromatography**

Edited by

Daidō Ishii

**Введение
в микромасштабную
высокоэффективную
жидкостную
хроматографию**

Редактор Д.Исии

Перевод с английского
канд. хим. наук Д.Н. Соколова

Под редакцией
д-ра хим. наук В.Г. Березкина



VCH

Москва "Мир" 1991

ББК 24.5
В24
УДК 543.544

Авторы: Гото М., Джинно К., Исии Д., Сайто М., Сенда М., Такеучи Т.; Уода А., Хиби К., Хигасидате С., Цуге С.

**В24 Введение в микромасштабную высокоэффективную жидкостную хроматографию: Перевод с англ./ Под ред. Д. Исии - М.: Мир, 1991. - 240 стр., ил.
ISBN 5-03-002027-6**

Книга написана коллективом авторов - известных японских специалистов - под общей редакцией профессора Д. Исии, который является основоположником микромасштабной высокоэффективной жидкостной хроматографии. Рассмотрены теоретические аспекты, аппаратное оформление метода, включая конструкции микроколонок и узлов жидкостного хроматографа, и системы детектирования. Приведены примеры определения желчных кислот, аминокислот, олигомеров, антиоксидантов в бензине, лекарств.

Для химиков-аналитиков, физикохимиков, а также для студентов и аспирантов, специализирующихся в области хроматографии.

1707000000-117
В $\frac{1707000000-117}{041(01)-91}$ 60-91

ББК 24.5

Редакция литературы по химии

ISBN 5-03-002027-6 (русск.)
ISBN 0-89573-309-9 VCH Publishers (англ.)
ISBN 3-527-26636-4 VCH Verlagsgesellschaft

© 1988 VCH Publishers
© перевод на русский язык,
Д.Н.Соколов, 1991

Научное издание

М. Гото, К. Джинно, Д. Исии и др.

**ВВЕДЕНИЕ В МИКРОМАСШТАБНУЮ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНУЮ
ЖИДКОСТНУЮ ХРОМАТОГРАФИЮ**

Зав. редакцией академик О.А. Реутов. Зам.зав.редакцией Т.И. Почкаева.
Старший научный редактор Р.И. Краснова. Младший научный редактор
О.А. Половнева. Художественный редактор М.Н. Кузьмина. Художник
Т.А. Бучаченко. Корректор Г.И. Герман.

ИБ N 7635

Оригинал-макет подготовлен на персональном компьютере и отпечатан на лазерном принтере в издательстве "Мир"

Сдано в набор 21.06.90. Подписано к печати 20.09.91. Формат 60 x 88 1/16.
Бумага офсетная N 1. Гарнитура таймс. Печать офсетная. Объем 7,50 бум. л.
Усл. печ. л. 14,70. Усл. кр.-отт. 15,00. Уч.-изд. л. 13,57. Изд. N 3/7802.
Тираж 2000 экз. Заказ 2708. Цена 5 р.

Издательство "Мир". 129820 Москва, ГСП, И-110, 1-й Рижский пер., 2.

Отпечатано в Московской типографии N 9 НПО "Всесоюзная книжная палата"
109033 Москва, Волочаевская ул., 40.

Предисловие редактора перевода

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) продолжает активно развиваться и в настоящее время. Миниатюризация размеров колонки - одно из важных направлений принципиального улучшения характеристик этого метода. Микромасштабная колоночная ВЭЖХ по сравнению с классической имеет следующие преимущества: 1) повышенная эффективность; 2) большая экономичность в результате уменьшения расхода подвижной и неподвижной фаз; 3) лучшие характеристики процессов с программированием температуры; 4) простота сочетания с масс-спектрометром в качестве детектора; 4) более простая реализация оптимальных условий разделения.

Книга "Введение в микромасштабную ВЭЖХ" (под редакцией д-ра Д. Исии) написана ведущими японскими учеными, которые внесли существенный вклад в развитие микромасштабной хроматографии на мировом уровне. В книге рассмотрены все основные аспекты микромасштабной ВЭЖХ: теория, аппаратура и практическое применение метода. Научный уровень ее весьма высок, а изложение отличается четкостью и компактностью.

Мне представляется уместным сделать одно небольшое дополнение, касающееся истории развития метода. Наряду с именами К.Хорвата, Б.Прайсса, С.Липского (1967 г.), Д.Исии (1974 г.), Р.Скотта, П.Кучеры (1976 г.), вклад которых в развитие микромасштабной ВЭЖХ справедливо отмечен в данной монографии, необходимо назвать имена и советских исследователей, также ставших пионерами в развитии этого метода*. Это Л.С.Сандахчиев (1973 г.), М.А.Грачев (1973 г.), С.В.Кузьмин (1973 г.).

В целом книга несомненно отражает современное состояние микромасштабной жидкостной хроматографии. Она может быть рекомендована широкому кругу специалистов, работающих в области жидкостной хроматографии, а также студентам и аспирантам многих химических специальностей.

В.Г.Березкин

* Более подробное изложение истории развития метода, а также основы микромасштабной жидкостной колоночной хроматографии читатель может найти в монографии Б.Г.Беленького, Э.С.Ганкиной, В.Г.Мальцева "Капиллярная жидкостная хроматография" (Л.: Наука, 1987).

Предисловие к русскому изданию

В последнее десятилетие исследования в области миниатюризации колонок для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) привлекают внимание многих хроматографистов. В этой книге, написанной известными японскими специалистами по микромасштабной ВЭЖХ, изложены основы метода, которые необходимо знать тем, кто только приступает к его освоению, и приведена подробнейшая информация о практическом его применении, которая, мы надеемся, окажет помощь всем тем, кто уже имеет дело с микро-ВЭЖХ.

Я хочу поблагодарить д-ра В.Г. Березкина за активное участие в подготовке к изданию на русском языке книги "Введение в микромасштабную ВЭЖХ". Я буду счастлив, если хроматографисты СССР разделят наш энтузиазм в отношении микромасштабной ВЭЖХ. Миниатюризация в компьютерной технологии и электронике внесла существенный вклад в повышение их эффективности и скорости. Я полагаю, что аналогичная ситуация справедлива также и для ВЭЖХ.

Дайдо Исии

Предисловие

*"Легче верблуду пролезть в игольное ушко,
чем богатому попасть в царствие небесное".
Евангелие от Матфея*

В наши дни высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) приобрела распространение благодаря прогрессу в приборостроении, базирующемуся на достижениях механики, электроники и вычислительной техники. В настоящее время основные усилия исследователей в этой области направлены на увеличение селективности и эффективности, разделения, повышение чувствительности и ускорение анализа. Один из путей решения этих задач - уменьшение размеров колонки.

Автор этих строк сделал свое первое сообщение на тему о "микромасштабной высокоэффективной жидкостной хроматографии" в Токио на Конференции по прикладной спектроскопии в 1973 г. С тех пор число исследователей, интересующихся проблемой миниатюризации колонок, существенно возросло. Однако микро-ВЭЖХ пока еще не достигла универсальности и популярности обычной ВЭЖХ.

Настоящая книга должна послужить источником как предварительной, так и более глубокой информации для тех, кто интересуется микро-ВЭЖХ и собирается практически использовать этот метод. Читатель найдет здесь сведения как об исследованиях, ведущихся в настоящее время, так и о практическом применении метода.

В литературе, посвященной микро-ВЭЖХ, используется различная терминология. В настоящей книге методы ВЭЖХ классифицируются в зависимости от вида насадки и объема колонки (так, насадочная ВЭЖХ подразделяется на обычную, полумикро-ВЭЖХ и микро-ВЭЖХ). Особенность этой книги состоит в том, что большая ее часть посвящена применению метода. Я надеюсь, что книга позволит читателю составить достаточно полное представление о микро-ВЭЖХ и возможностях ее использования.

В заключение выражаю признательность всем, кто оказал мне помощь в работе над книгой. Я глубоко благодарен д-ру Лесли Эттре (фирма Перкин-Элмер), который взял на себя труд прочесть рукопись и сделать ряд ценных замечаний и предложений. Я благодарю также д-ра Эдмунда Иммергута (издательство VCH) и Микио Такахаси (фирма JASCO International Company), которые первыми включили эту книгу в издательский план, а также Масако Мацумае и Йоко Амемия (фирма JASCO) за помощь по перепечатке рукописи.

*Дайдо Исии
Университет Нагойи*

1. ВВЕДЕНИЕ

Д. Исии, Т. Такеучи*

1.1. ХАРАКТЕРИСТИКИ МИКРОМАСШТАБНОЙ ВЭЖХ

Внутренний диаметр (ВД) аналитических насадочных колонок, применяемых в высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), обычно равен 4-6 мм, и серийные хроматографы предназначены для работы именно с такими колонками. Размеры колонки лимитируются также объемом ячейки детектора и конструкцией уплотнений (фитингов). Исследования, направленные на миниатюризацию аналитических колонок в ВЭЖХ, были начаты группами Хорвата [1], Скотта [2] и Исии [3, 4]. Исии и сотрудники использовали в качестве колонки политетрафторэтиленовую (ПТФЭ) трубку внутренним диаметром 0,5 мм. Свой метод они назвали *микро-ВЭЖХ*. Группы Хорвата и Скотта применили в качестве колонок стальные трубки внутренним диаметром 1 мм, которые они назвали *насадочными микрокололками*. В каждом случае вновь созданные приборы испытывались в лаборатории, и по мере совершенствования прикладных методов характеристики микро-ВЭЖХ постепенно улучшались. Как следует из самого названия метода, он предусматривает работу с колонками малого диаметра. Микро-ВЭЖХ позволит:

- 1) проводить разделение с малодоступными или дорогими реактивами, поскольку расход подвижной и неподвижной фаз в этом случае мал;
- 2) повысить чувствительность;
- 3) достичь при использовании длинных колонок высокой эффективности разделения;
- 4) упростить программирование температуры;
- 5) облегчить достижение заданных условий разделения;
- 6) применить масс-спектрометрию (МС) в целях обнаружения разделенных соединений.

С уменьшением размеров колонки снижается расход неподвижной фазы, что позволяет применять труднодоступные и дорогие насадки и длинные колонки. Кроме того, микро-ВЭЖХ упрощает работу с токсичными, пожароопасными или необычными подвижными фазами, например с низкомолекулярными алканами, диоксидом углерода или дейтерированными растворителями, что делает в принципе возможным применение микро-ВЭЖХ в сверхкритической флюидной хроматографии.

Если предположить, что эффективность разделения на двух колонках различного диаметра одинакова, то концентрация элюируемых из колонки компонентов обратно пропорциональна квадрату ее внутреннего диаметра или, что то же самое, сечению колонки. Следовательно, микро-ВЭЖХ в сочетании с концентрационным детектором, по-видимому, повысит чувствительность обнаружения, что особенно важно при определении примесей, а также при проведении биохимических анализов.

Известно, что в обычной ВЭЖХ эффективность хроматографической системы, полученной путем последовательного соединения нескольких колонок (с целью повышения эффективности разделения), не пропорциональна суммарной длине колонок. В то же время в микро-ВЭЖХ благодаря уменьшению вихревой диффузии и более эффективному отводу тепла, выделяющегося вследствие перепада давления, увеличение длины колонки позволяет достигнуть достаточно высокой эффективности системы. Выделяющаяся в колонке теплота влияет на процессы массопереноса, что ухудшает эффективность разделения. Поэтому температуру в колонке следует поддерживать постоянной. Малая теплоемкость микроколонок упрощает программирование температуры в ВЭЖХ. Этот прием получил широкое распространение в газовой хроматографии (ГХ).

Разделение методом ВЭЖХ часто проводится при градиентном элюировании и программировании скорости потока. Что касается программирования температуры, то к нему прибегают при разделении термостойких соединений; достигаемый при этом эффект аналогичен получаемому при градиентном элюировании. Для нахождения оптимальных условий разделения новых объектов приходится расходовать большие объемы подвижной фазы и испытывать колонки различных типов. Микро-ВЭЖХ существенно облегчает задачу, поскольку в этом случае для нахождения оптимального состава элюента достаточно всего несколько миллилитров подвижной фазы.

Другим преимуществом микро-ВЭЖХ является возможность ее сочетания с масс-спектрометрией (МС). Чем меньше расход подвижной фазы, тем легче осуществляется прямое сочетание ЖХ с МС. Следовательно, для создания удовлетворительной системы ЖХ/МС внутренний диаметр колонки должен быть как можно меньше.

ГХ на открытых колонках (капиллярная ГХ), впервые предложенная Голеем [5-7], нашла чрезвычайно много приверженцев, поскольку этот метод позволяет получить большее число теоретических тарелок на единицу времени и на единицу перепада давления благодаря высокой (по сравнению с обычными насадочными колонками) проницаемости открытых капиллярных колонок. Открытые (безнасадочные) [8] и наса-

*D.Ishii, T.Takeuchi, Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya 464, Japan.

дочные [9] капиллярные колонки испытывались и в жидкостной хроматографии. Как выяснилось, они позволяют достигнуть весьма высокой эффективности разделения.

1.2. КЛАССИФИКАЦИЯ МЕТОДОВ МИКРОМАСШТАБНОЙ ВЭЖХ

Методы микро-ВЭЖХ классифицируются в соответствии с типом насадки и размерами колонок. Колонки для микро-ВЭЖХ обычно можно разделить на три категории в зависимости от типа насадки: 1) плотно упакованные колонки, 2) свободно упакованные колонки и 3) открытые безнасадочные колонки. Эти различия иллюстрируются рис. 1.1. К первой группе относятся колонки для обычной ВЭЖХ, а также насадочные колонки типа предложенных группами Хорвата [1], Скотта [2] и Исии [3]. Цуда и Новотны [9] изучили возможность разделения на колонках второго типа, которые они назвали насадочными капиллярными колонками, в режиме ЖХ. Отношение диаметра колонки данной группы к диаметру частиц насадки составляет приблизительно 2,5, что значительно меньше той же величины для обычных колонок с плотной упаковкой. Проницаемость насадочных капиллярных колонок выше, чем у плотно упакованных и ниже, чем у открытых безнасадочных колонок.

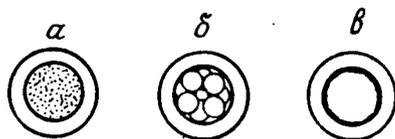


Рис. 1-1. Колонки для микро-ВЭЖХ с различными типами насадки: - плотноупакованные (*а*); - свободноупакованные (*б*); - открытые безнасадочные (*в*).

Открытые колонки отличаются от колонок других типов тем, что роль носителя неподвижной фазы в данном случае выполняет внутренняя поверхность капилляра. При попытке применить в ЖХ [1, 10] капиллярные колонки, аналогичные используемым в ГХ, выяснилось, что эффективность их мала из-за малой скорости диффузии молекул в жидкости. Как показали Исии и сотр. [8], для разделения методом ЖХ пригодны открытые капиллярные колонки диаметром менее 60 мкм. Характеристики колонок подробно рассмотрены в гл. 3.

Колонки с плотной набивкой обычно можно подразделить на три категории в зависимости от их диаметра: колонки для обычной ВЭЖХ, для полумикро-ВЭЖХ и для микро-ВЭЖХ. В табл. 1-1 перечислены типичные размеры таких колонок и проведено их сопоставление с насадочными и открытыми капиллярными колонками. Для полумикро-ВЭЖХ пригодны колонки внутренним диаметром 1-2 мм и насадочные микроколонки, впервые описанные Хорватом и Скоттом. В табл. 1-1 сравнивается также поперечное сечение колонок различных типов. В общем случае объемы колонок для полумикро- и микро-ВЭЖХ соответственно в десять и в сто раз меньше объема колонок для обычной ВЭЖХ.

Таблица 1-1. Типичные размеры колонок для ВЭЖХ

Тип колонки	Внутренний диаметр, мм	Относительное поперечное сечение ^а
С плотной набивкой для: обычной ВЭЖХ полумикро-ВЭЖХ микро-ВЭЖХ	4-6	16-36
	1-2	1-4
	0,2-0,5	0,04-0,25
Свободноупакованные (насадочные капиллярные)	0,05-0,2	0,0025-0,04
Открытые безнасадочные (капиллярные)	0,01-0,06	0,0001-0,0036

^а Поперечное сечение колонки с внутренним диаметром 1 мм принимается равным единице.

В табл. 1-2 указаны типичные диаметры колонок и расходы подвижной фазы для каждого типа ВЭЖХ. При этом принимается, что диаметр колонки для обычной ВЭЖХ равен 4,6 мм, поскольку именно такие колонки получили наибольшее распространение. Последняя строка табл. 1-2 относится к новой категории ЖХ, а именно ультрамикро-ВЭЖХ, в которой объем колонки составляет одну тысячную объема обычной колонки. Ультрамикро-ВЭЖХ мы не рассматриваем, поскольку пока ей посвящено всего несколько работ [11, 12].

В обычной ВЭЖХ и полумикро-ВЭЖХ чаще всего разделение проводится на колонках из нержавеющей стали, тогда как в микро-ВЭЖХ используются колонками из обычного или кварцевого стекла и политетрафторэтилена. Для изготовления открытых и насадочных капиллярных колонок применяются также капилляры из мягкого стекла (пирекса).

Таблица 1-2. Наиболее употребительные диаметры колонок и объемные скорости подвижной фазы в ВЭЖХ разных типов

Тип ВЭЖХ	Внутренний диаметр, мм	Объемная скорость, мкл/мин
Обычная	4,6	1000
Полумикро-	1,5	100
Микро-	0,46	10
Ультрамикро-	0,15	1

1.3. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОЛОНОК

При разделении методом ЖХ на открытых и насадочных капиллярных колонках достигнуть высокого разрешения удается путем простого увеличения длины колонки. Бристоу и Нокс [13] предложили параметр, позволяющий сравнивать эффективности колонок, отнесенные к единице времени или к единице перепада давления. Этот параметр (сопротивление разделению, E) вычисляется по формуле:

$$E = \frac{t_0}{N} \times \frac{\Delta P}{N} \times \frac{1}{\eta} \quad (1)$$

где t_0 - время элюирования неудариваемого компонента, N - число теоретических тарелок, ΔP - перепад давления на колонке, η - вязкость подвижной фазы. Этот параметр удобен для сравнения эффективности колонок различных типов, а также колонок одного типа, работающих в разных условиях. Параметр E безразмерный, его можно выразить через другие безразмерные параметры [14]:

$$E = h^2 \phi \quad (2)$$

где h - приведенная высота, эквивалентная теоретической тарелке; ϕ - параметр, характеризующий сопротивление колонки. Приведенная высота, эквивалентная теоретической тарелке, для открытой ЖХ-колонки выражается отношением высоты, эквивалентной теоретической тарелке, к диаметру колонки [14]. Чем меньше сопротивление разделению, тем выше эффективность колонки.

Табл. 1-3 позволяет сравнить сопротивление разделению колонок высокого разрешения различных типов.

Таблица 1-3. Параметры колонок высокого разрешения различных типов [14]

Тип колонки	Внутренний диаметр, мкм	Длина, м	Диаметр частиц, мкм	d_c/d_p^a	ϕ
Плотноупакованная	250-1000	1-14	5-30	50-200	500-1000
Свободноупакованная	50-200	20-100	10-100	2-8	100-300
Открытая безнасадочная (капиллярная)	10-60	20-40	-	-	32

d_c - диаметр колонки; d_p - диаметр частицы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Horvath C.G., Preiss B.A., Lipsky S.R., Anal. Chem., 1967, 39, 1422.
2. Scott R.P.W., Kucera P. J. Chromatogr., 1976, 125, 251.
3. Ishii D. JASCO Report, 1974, 11 (no. 6).
4. Ishii D., Akai K., Hibi K., Jonokuchi T., Nagaya M. J. Chromatogr., 1977, 144, 157.
5. Golay M.J.E. Anal. Chem., 1957, 29, 928.
6. Golay M.J.E. Anal. Chem., 1957, 180, 435.
7. Golay M.J.E. In "Gas Chromatography 1958, Desty D.H., Ed.; Butterworths, London, 1958, p.36.
8. Hibi K., Ishii D., Fujishima I., Takeuchi T., Nakanishi T. J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun., 1978, 1, 21.
9. Tsuda T., Novotny M. Anal. Chem., 1978, 50, 271.
10. Nota G., Marino G., Buonocore V., Ballio A. J. Chromatogr., 1970, 46, 103.
11. Takeuchi T., Ishii D. J. Chromatogr., 1980, 190, 150.
12. Takeuchi T., Ishii D. J. Chromatogr., 1981, 218, 199.
13. Bristow P.A., Knox J.H. Chromatographia, 1977, 10, 279.
14. Knox J.H. J. Chromatogr. Sci., 1980, 18, 453.

2. ОСОБЕННОСТИ АППАРАТУРЫ, ПРЕДНАЗНАЧЕННОЙ ДЛЯ МИКРОМАСШТАБНОЙ ВЭЖХ

М. Сайто, К. Хиби, Д. Исии, Т. Такеучи*

2.1. ВВЕДЕНИЕ

Микромасштабная ВЭЖХ была разработана почти одновременно с ее обычным вариантом. В 1967 г. Хорват и сотр. [1, 2] исследовали разделение нуклеотидов на колонке внутренним диаметром 1 мм и длиной около 2 м, т.е. колонки относительно большого объема. Новый метод ВЭЖХ, названный *микро-ВЭЖХ*, появился в 1973 г., после того как Исии и сотр. [3 - 5] удалось осуществить успешное разделение многоатомных ароматических углеводородов с повышенной чувствительностью на самодельном приборе для микро-ВЭЖХ с колонкой из ПТФЭ очень малого объема (0,5 мм (внутр. диам.) x 150 мм), наполненной поверхностно-пористым материалом [3 - 5]. В 1967 г. Скотт и Кучера [6, 7] описали высокоэффективное разделение алкилбензолов на колонке размером 1 мм (внутр. диам.) x 10 м. Детектором в данном случае служил УФ-спектрометр с проточной кюветой объемом 2,4 мкл. В том же году фирма JASCO** выпустила в продажу первый серийный прибор для микро-ВЭЖХ под названием FAMILIC-100 (Fast Micro Liquid Chromatograph - быстродействующий микромасштабный жидкостной хроматограф), показанный на рис. 2.1 [8]. Этот прибор оснащен стеклянным шприцевым насосом с винтовым приводом и УФ-детектором с регулируемой длиной волны и проточной микрокюветой объемом 0,3 мкл. Однако вплоть до последнего времени микро-ВЭЖХ не пользовалась особой популярностью у большинства хроматографистов.

Первые колонки для ВЭЖХ имели внутренний диаметр 1,6-3 мм и длину 500-1000 мм. Заполняли их поверхностно-пористым материалом размером 30 мкм. С появлением пористых микроадсорбентов с размером частиц 5-10 мкм внутрен-

*M.Saito, K.Hibi, Japan Spectroscopic Company, Ltd. Nachioji City, Tokyo 192, Japan. D.Ishii, T.Takeuchi, Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya 464, Japan.

**Japan Spectroscopic Company, Ltd., 2967-5 Ishikawa-cho, Nachioji City, Tokyo 192, Japan

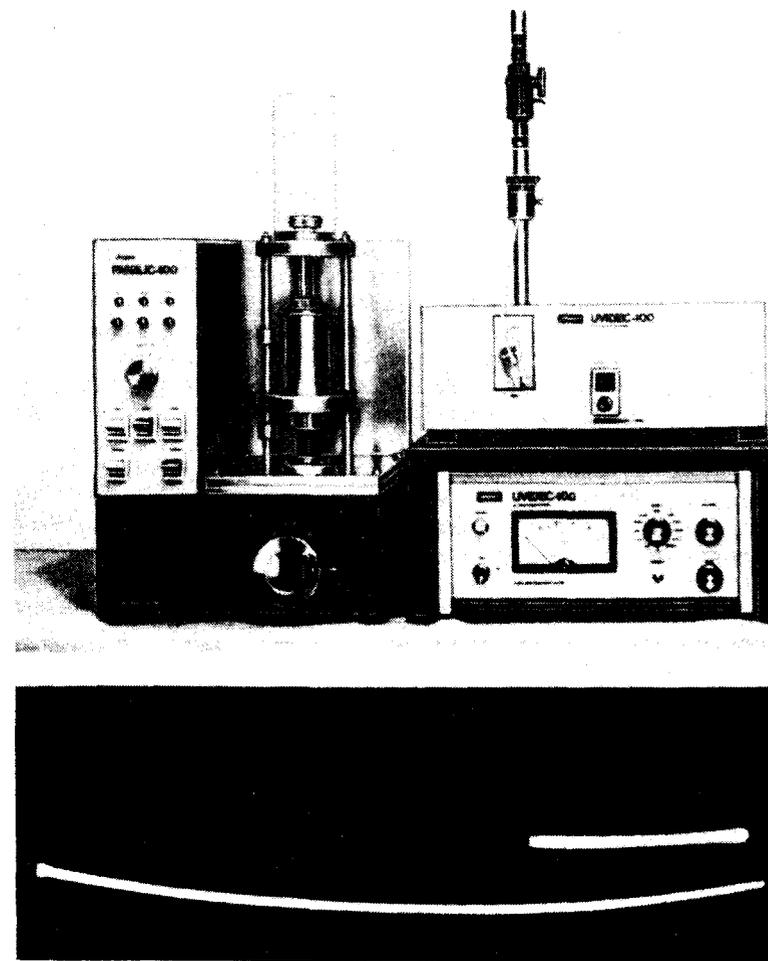


Рис. 2-1. Первый серийный прибор для микро-ВЭЖХ модели FAMILIC-100 фирмы JASCO и предназначенные для него колонки из политетрафторэтилена (с разрешения JASCO).

ний диаметр колонки увеличился до 5 - 6 мм. К этому времени большинство хроматографистов пришли к убеждению, что колонки самого малого диаметра работают плохо. Предпочтение отдавалось колонкам относительно большого диаметра ввиду сложности заполнения колонок малого диаметра насадкой с частицами размером 5-10 мкм. Кроме того, существовавшие в то время детекторы были мало пригодны для регистрации узких пиков, обычно элюируемых из колонок малого диаметра. Эти детекторы были предназначены в основном для работы с колонками размером 2,1 мм (внутр. диам.) x 500 мм, эффективность которых достигла 500 теоретических тарелок. Иначе говоря, они были предназначены для обнаружения пиков, соответствующих объему подвижной фазы порядка 200 мкл и более. В то же время эффективность колонки длиной 250 мм, заполненной микрочастицами, может достигать 10 000 тарелок. Это означает, что ширина пика неудерживаемого компонента при внутреннем диаметре колонки 2,1 мм и длине 250 мм должна составлять всего 24 мкл. Очевидно, что такая колонка несовместима с обычным детектором, у которого объем кювета составляет 8 мкл.

В связи с этим после появления насадок, состоящих из микрочастиц, следовало бы полностью пересмотреть конструкцию приборов для ВЭЖХ. Однако хроматографисты ограничились лишь тем, что увеличили внутренний диаметр колонки [9]. Для колонки размером 4,6 мм (внутр. диам.) x 250 мм объем подвижной фазы, соответствующей пику неудерживаемого компонента, составляет около 100 мкл. Такой пик можно обнаруживать посредством детектора с кюветой объемом 8 мкл без заметного уменьшения эффективности разделения, однако чувствительность при этом заметно снижается.

Хроматография - это процесс разделения, который сопровождается разбавлением. Коэффициент разбавления пропорционален длине колонки и квадрату ее диаметра и обратно пропорционален корню квадратному из числа теоретических тарелок. Это означает, что при хроматографировании на колонке внутренним диаметром 4,6 мм концентрации выходящих из нее соединений почти столь же малы, как и при разделении на применявшихся ранее колонках с пористыми насадками [10], хотя число теоретических тарелок в первом случае в 20 раз больше. Следовательно, если хроматографист хочет получить оптимальные результаты при разделении на современной мелкодисперсной насадке, он должен внимательно пересмотреть все основные параметры выбранной им системы, такие, как объем пика, концентрация в максимуме пика, расход элюента, объем вводимой пробы, объем ячейки детектора и т.п.

2.2. ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МИКРОМАСШТАБНОЙ ВЭЖХ

2.2.1. Объем пика

При проектировании системы ВЭЖХ, включающей колонку малого объема, прежде всего необходимо оценить возможный объем пика, поскольку этот фактор определяет большинство других характеристик прибора. Если принять, что концентрация компонента в колонке распределяется по гауссиане и эффективность колонки составляет N теоретических тарелок, то объем элюирующегося из колонки пика V_p равен четырем стандартным отклонениям (4σ) кривой распределения и может быть выражен следующим образом:

$$V_p = 4\sigma = \frac{4V_R}{\sqrt{N}} = \frac{4V_0(1+k')}{\sqrt{N}} \quad (1)$$

где V_r - удерживаемый объем, V_0 - свободный объем колонки (объем удерживания неудерживаемого пика) и k' - коэффициент емкости. Свободный объем колонки (V_0) определяется выражением

$$V_0 = \frac{\pi d_c^2 \epsilon L}{4} \quad (2)$$

где d_c - диаметр колонки, L - ее длина; ϵ - коэффициент пористости насадки. С учетом этого выражения уравнение (1) можно записать следующим образом:

$$V_p = 4\sigma = \frac{\pi d_c^2 \epsilon L (1+k')}{\sqrt{N}} \quad (3)$$

Таким образом, объем пика пропорционален квадрату диаметра колонки и ее длине и обратно пропорционален корню квадратному из числа теоретических тарелок. В табл. 2-1 приведены объемы пиков неудерживаемых компонентов для различных колонок.

23.951

Таблица 2-1. Объем пика, соответствующего неударживаемому компоненту, и относительная концентрация компонента в максимуме пика для разных колонок

Внутренний диаметр, мм	Длина L , мм	Число теоретических тарелок N	Объем пика V_p , мкл	Относительная концентрация компонента в максимуме пика
2,1	500	500	200	0,5
4,6	250	10000	100	1
1,5	250	10000	10	10
0,5	250	10000	1	100

2.2.2. Концентрация в максимуме пика

При хроматографическом разделении проба, введенная в колонку, в процессе элюирования разбавляется некоторым количеством подвижной фазы. Говоря точнее, около 95% элюируемого компонента распределяется в объеме элюента, соответствующем 4б объема пика (V_p).

Общее содержание компонента в пике можно вычислить путем интегрирования кривой распределения концентраций. Площадь пика A определяется как:

$$A = \sqrt{2\pi} \sigma C_{max} \quad (4)$$

где C_{max} - концентрация в максимуме пика, а σ - стандартное отклонение распределения концентраций (которое предположительно описывается гауссианой), выраженное в единицах объема раствора. Следовательно, если заменить в уравнении (4) σ на $V_p/4$, то концентрацию в максимуме пика для пробы с массой m_s можно определить из выражения

$$C_{max} = \frac{2\sqrt{2} m_s}{\sqrt{\pi} f_R V_p} \cong \frac{1.6m_s}{f_R V_p} \quad (5)$$

$$C_{max} = \frac{2\sqrt{2} m_s \sqrt{N}}{f_R \pi^{3/2} d_c^2 \epsilon L (1 + k')} \quad (5a)$$

где f_R - отклик детектора, соответствующий данной массе пробы m_s ($m_s = f_R A$). Из уравнения (5) следует, что концентра-

ция компонента в максимуме пика C_{max} пропорциональна корню квадратному из числа теоретических тарелок N и обратно пропорциональна длине колонки L и квадрату ее диаметра d_c^2 . С помощью уравнения (5a) можно вычислить относительные концентрации в максимуме пика для колонок различных размеров и различной эффективности (см. табл. 2-1). Как следует из табл. 2-1, с уменьшением размеров колонки, особенно ее диаметра, концентрация компонента в максимуме пика резко возрастает. Это означает, что при той же самой массе пробы чувствительность обнаружения может быть повышена. В этом состоит одно из важнейших преимуществ колонок малого объема.

2.2.3. Расход элюента

Расход подвижной фазы является одной из важнейших характеристик системы ВЭЖХ. Линейная скорость подвижной фазы определяется выражением

$$u = L/t_0 \quad (6)$$

где L - длина колонки, t_0 - время удерживания неударживаемого компонента. Объемная скорость элюента F выражается через свободный объем колонки V_0 :

$$F = V_0/t_0 \quad (7)$$

Заменив V_0/F на t_0 и используя уравнения (2) и (6), можно выразить соотношение между линейной u и объемной F скоростями элюента:

$$u = \frac{4F}{\pi d_c^2 \epsilon} \quad (8)$$

Таким образом, для поддержания одной и той же линейной скорости в колонках разного диаметра объемная скорость в них должна быть уменьшена пропорционально квадрату отношения их диаметров.

Рис. 2-2 показывает взаимосвязь между расходом элюента и диаметром колонки для наиболее часто используемых линейных скоростей элюента. В табл. 2-2 указаны объемы и высоты пиков (концентрации в максимуме пика), объемные скорости элюента и суммарные расходы элюента, вычисленные для колонок различных размеров в одинаковых хроматографических условиях с одним и тем же числом теоретических тарелок

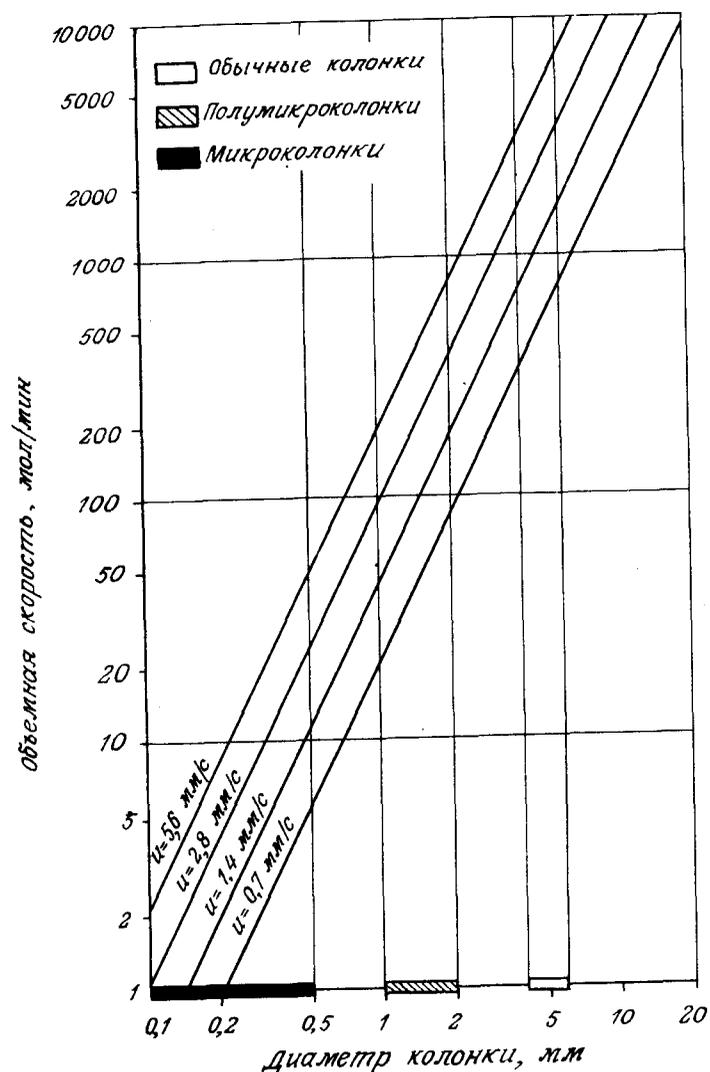


Рис. 2-2. Объемная скорость подвижной фазы в колонках разного диаметра при одинаковой линейной скорости. Во всех случаях пористость насадки $\epsilon = 0,7$.

Таблица 2-2. Сравнительные хроматографические характеристики обычных, полумикро- и микроколонок^а

Характеристика колонки	Тип колонки (длина, мм; внутр. диам., мм)		
	Обычная (250; 4,6)	Полумикро- (250; 0,5)	Микро- (250; 1,5)
Линейная скорость подвижной фазы u , мм/с	1,4	1,4	1,4
Объемная скорость подвижной фазы F , мл/мин	1,0	0,1	0,01
Объем пика V_p , мкл	116	12	1,4
Высота пика S_{max} , %	1,2	12	100
Расход растворителя за 7 ч работы, мл	420	42	4,2

^а Пористость колонки $\epsilon = 0,7$; коэффициент емкости $k' = 0$; число теоретических тарелок $N = 10\ 000$.

при одинаковой линейной скорости подвижной фазы. Нетрудно заметить, что при одинаковой длине колонок концентрация в максимуме пика для колонок внутреннего диаметром 1,5 и 0,5 мм соответственно в 10 и в 100 раз выше, чем для обыч-

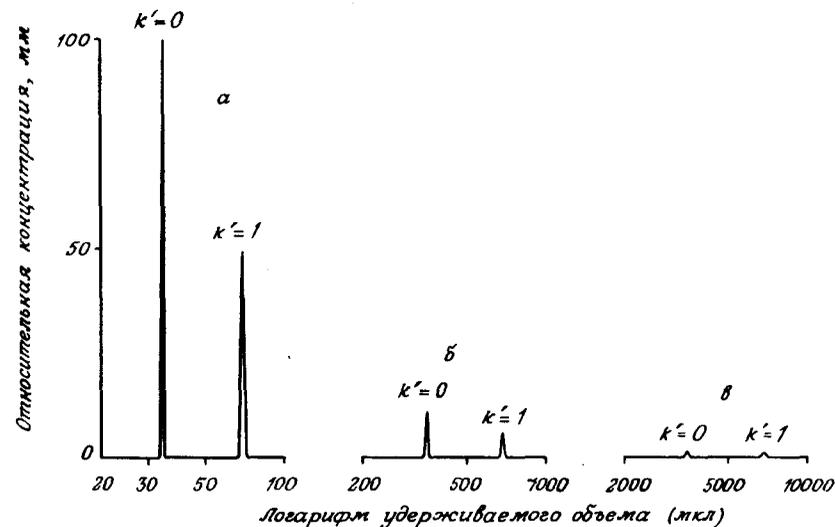


Рис. 2-3. Расчетные хроматограммы для а: обычной колонки (4,6 мм x 250 мл); б: колонки объемом в 10 раз меньше (1,5 мм x 250 мм) и в: колонки объемом в 100 раз меньше, чем у обычной (0,5 мм x 250 мм).

ной колонки внутренним диаметром 4,6 мм и такой же длиной. В то же время расход элюента для колонок диаметром 1,5 и 0,5 мм в соответственное число раз меньше, чем для обычной колонки. На рис. 2-3 схематически изображены хроматограммы проб одинаковой массы, полученные на обычной колонке внутренним диаметром 4,6 мм и на колонках внутренним диаметром 1,5 и 0,5 мм.

Из сказанного можно сделать вывод, что тонкодисперсная насадка непригодна для колонок обычных размеров (4,6 мм (внутр. диам.) x 250 мм) и что колонки меньших размеров соответствуют ей гораздо в большей степени.

2.3. ТРЕБОВАНИЯ К АППАРАТУРЕ ДЛЯ ВЭЖХ

2.3.1. Микроколонки

Колонки малого объема называют по-разному. Чаще всего употребляют термин "колонки малого внутреннего диаметра". Однако колонки следует классифицировать не по диаметру внутреннего канала (внутреннему диаметру), а по объему, так как колонкам с одинаковым свободным объемом соответствует одинаковый объем пика, независимо от диаметра канала. Поэтому колонку, объем которой составляет одну сотую или меньше объема обычной колонки, мы рекомендуем называть микроколонкой, а колонку объемом примерно в одну десятую объема обычной колонки, - полумикроколонкой.

Микро- и полумикроколонки подробно описаны в гл. 3. От обычных колонок их отличают следующие особенности:

1. Объем пика, объемная скорость элюента и суммарный расход элюента для микроколонок в 100 раз, а для полумикроколонок - в 10 раз меньше, чем для обычных колонок.

2. Концентрация определяемого компонента в максимуме пика для микроколонок в 100, а для полумикроколонок в 10 раз больше, чем для обычных колонок.

Очень важно также то обстоятельство, что полумикроколонки в настоящее время изготавливаются несколькими фирмами и что эти колонки совместимы с большинством обычных хроматографических насосов. Имеются также в продаже соответствующие детекторы (преимущественно УФ-спектрометры) и системы ввода пробы.

Для достижения высокой эффективности микроколонок очень важно, чтобы мертвые объемы в хроматографической системе были сведены к минимуму. При соблюдении этого условия внеколоночное размывание пика не ухудшит разделения, достигнутого в колонке. Недавно появились в продаже также насосы и системы ввода пробы для микроколонок (разд. 3.2).

2.3.2. Внеколоночное размывание пика

Изучением внеколоночного размывания пика занимались многие исследователи [1,3,4,7,9,11-24]. В настоящем разделе приводится лишь краткий обзор работ на эту тему.

Вариация (квадрат стандартного отклонения) наблюдаемого пика ($\sigma_{p(набл)}^2$) может быть выражена суммой вариаций пика, связанных с внутривидовыми эффектами (σ_p^2), и вариаций, связанных с внеколоночным размыванием пика (σ_{ex}^2) [11], т. е.

$$\sigma_{p(об)}^2 = \sigma_p^2 + \sigma_{ex}^2 \quad (9)$$

Поскольку объем пика равен четырем стандартным отклонениям (σ), то уравнение (9) можно записать следующим образом:

$$V_{p(об)}^2 = V_p^2 + V_{ex}^2 \quad (10)$$

где V_p - объем пика, определяемый вкладом колонки, а V_{ex} - объем пика, определяемый внеколоночным размыванием и представляющий собой сумму вкладов системы ввода пробы, ячейки детектора и соединительных трубок. Разделив обе части уравнения (10) на V_p^2 , получаем:

$$(V_{p(об)}/V_p)^2 = 1 + (V_{ex}/V_p)^2 \quad (11)$$

Следовательно, если принять, что объем наблюдаемого пика превышает объем колоночного пика V_p на 10%, то объем внеколоночного пика должен составлять около половины (46%)

Таблица 2-3. Максимальный объем внеколоночного пика для различных колонок^а

Тип колонки	Длина, мм x внутр. диаметр, мм	Макс. объем внеколоночного пика V_{ex} , мкл ^б	Объем пика V_p
Обычная	250 x 4,6	53	116
Полумикро-	250 x 1,5	5,5	12
Микро-	250 x 0,5	0,6	1,4

^а Пористость колонки $\epsilon = 0,7$; коэффициент емкости $k' = 0$; число теоретических тарелок $N = 10000$.

^б Допускается увеличение объема пика на 10%.

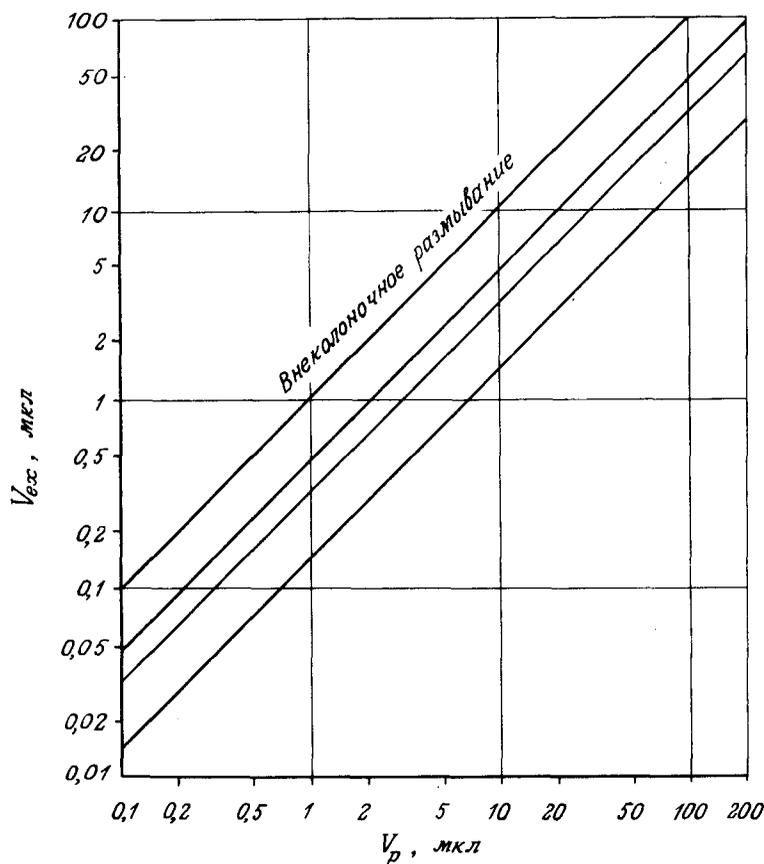


Рис. 2-4. Взаимосвязь между объемами колоночного и внеколоночного пиков для различных степеней внеколоночного размывания пиков.

колоночного. В табл. 2-3 приведены объемы колоночных и внеколоночных пиков для колонок различных типов. На рис. 2-4 показана взаимосвязь между объемами колоночных и внеколоночных пиков для различных величин внеколоночного размывания.

2.3.3. Основные причины размывания пиков

Размывание пика в системе ВЭЖХ обусловлено несколькими причинами, главными из которых являются дисперсия в

ламинарном потоке и эффекты диффузии и перемешивания в камере.

В ламинарном потоке профиль скоростей в трубке круглого сечения описывается уравнением Хейгена - Пуазейля и представляет собой параболу:

$$u(r) = \frac{\Delta P}{4\eta l_1} (r_0^2 - r^2) \quad (12)$$

где $u(r)$ - функция, описывающая зависимость скорости потока от расстояния r от центра трубки, r_0 - внутренний радиус трубки, l_1 - длина трубки, ΔP - перепад давления вдоль трубки и η - вязкость. В центре трубки ($r = 0$) скорость потока максимальна и равна

$$u_{max} = \frac{\Delta P r_0^2}{4\eta l_1} \quad (13)$$

В то же время на стенке трубки ($r = r_0$) скорость потока минимальна и равна нулю. Для вычисления средней скорости потока u_{av} необходимо проинтегрировать уравнение (12) и полученный результат разделить на площадь поперечного сечения трубки:

$$u_{av} = \frac{\Delta P r_0^2}{8\eta l_1} = \frac{u_{max}}{2} \quad (14)$$

Таким образом, скорость движения компонента в центре трубки вдвое превышает среднюю скорость потока. В то же время молекулы пробы, попавшие на стенки трубки, остались бы там навечно, если бы не существовал радиальный массоперенос. Последний осуществляется исключительно благодаря молекулярной диффузии, которая в жидкости происходит очень медленно. В результате *отставшая* часть компонента, попавшая на стенку трубки, медленно диффундирует в направлении уменьшения концентрации и при этом увлекается потоком. Таким образом, расстояние между опередившей и отставшей порциями компонента и определяет дисперсию. На рис. 2-5 схематически изображена дисперсия в ламинарном потоке. Эта проблема теоретически и экспериментально изучена Тейлором [25, 26], выводы которого были позднее подтверждены многими исследователями [4, 11, 12, 17, 18, 23, 27]. Следует отметить, что вариация пика, связанная с дисперсией ламинарного потока, пропорциональна скорости потока (см. разд. 2.3.7).

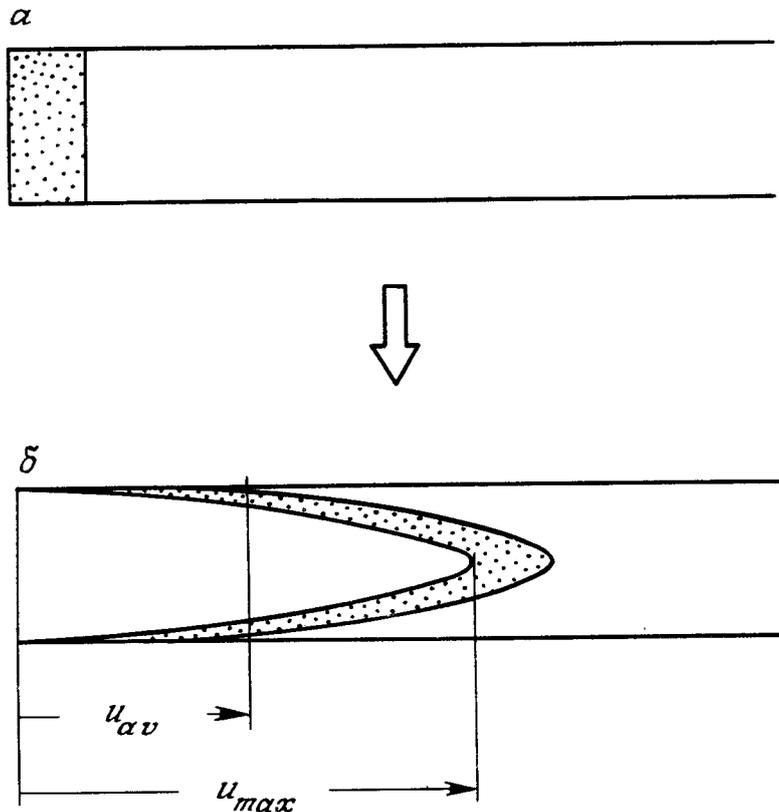


Рис. 2-5. Схематическое изображение дисперсии ламинарного потока. Компонент вводится в кошку в виде прямоугольной зоны (а). В процессе перемещения по трубке форма зоны изменяется вследствие параболического профиля скоростей потока (б).

При прохождении потока по трубке, имеющей резкие изменения диаметра и связанные с ними мертвые объемы, неизбежно возникают эффекты диффузии и смешивания в камере. Размывание этого типа имеет место при прохождении хроматографической зоны через систему ввода пробы, ячейку детектора, а также соединительные трубки и фитинги. Эффект диффузии в камере аналогичен дисперсии ламинарного потока в том смысле, что отставшая часть пробы диффундирует очень медленно. Однако профиль скоростей более сложен и зависит от геометрии канала. Поэтому вклад диффузии этого типа не

столь легко рассчитать, как дисперсию ламинарного потока в длинной прямой трубке [см. уравнение (2-25)]. Стернберг [11] показал, что диффузия и смешивание в камере функционально сходны с той только разницей, что в первом случае диффузия зависит от времени, а во втором - от скорости потока. Уменьшение концентрации пробы во времени под влиянием диффузии в камере обратно пропорционально коэффициенту молекулярной диффузии данного компонента, а уменьшение концентрации, обусловленное эффектом смешения в камере, обратно пропорционально скорости потока. Размывание пиков в результате этих эффектов имеет экспоненциальный характер и приводит к асимметричным пикам с "хвостами" [12]. С повышением скорости потока основную роль в радиальном массопереносе начинает играть не молекулярная, а вихревая диффузия. Если в результате вихревой диффузии концентрация по всей камере становится одинаковой, можно считать, что мы имеем идеальную камеру смешения. Временная вариация σ_t^2 камеры смешения выражается уравнением

$$\sigma_t^2 = (V_m/F)^2 \quad (15)$$

где V_m - объем камеры смешения, а F - скорость потока, или объемная скорость. Вариацию σ_v^2 можно выразить через объем подвижной фазы с помощью уравнения

$$\sigma_v^2 = V_m^2 \quad (16)$$

в котором она не зависит от скорости потока.

В реальных гидравлических системах ВЭЖХ все эти явления выступают в сложном сочетании. В первую очередь это относится к микро-ВЭЖХ и, следовательно, эффекты смешения в камере и диффузии могут давать более заметный вклад в суммарное размывание пика, чем в обычной ВЭЖХ. Поэтому из такой системы следует устранить даже небольшие мертвые объемы и максимально упростить конфигурацию каналов.

В следующем разделе рассмотрены вклады ячейки детектора, постоянной времени детектора и соединительных трубок в размывание пика и проведены расчеты допустимых значений основных параметров, характеризующих систему микро-ВЭЖХ.

2.3.4. Объем пробы

Если пробу объемом V_{inj} вводят в колонку в виде прямоугольной зоны (идеальный поршень), вариацию пика пробы σ_s^2 можно выразить уравнением

$$\sigma_s^2 = V_{inj}^2/12 \quad (17)$$

Если принять, что допустимое внеколоночное размывание пика составляет 5%, то, согласно расчету (путем подстановки уравнения (17) в уравнение (11)), допустимый вводимый объем пробы может достигать примерно одной трети (28%) объема колоночного пика. Однако осуществить ввод пробы в виде идеального поршня с помощью реального узла ввода невозможно. Следовательно, реальный вводимый объем должен быть меньше расчетного, причем величина его зависит от способа ввода пробы, т. е. от исходной кривой ее распределения [11, 14, 28-30].

В литературе описан ряд методов ввода пробы, предназначенных для микро-ВЭЖХ. Это метод остановки потока [3, 4, 31], метод деления потока [32, 33], метод "вырезания сердцевин" [34] и метод, основанный на применении миниатюрных кранов-дозаторов [7, 35, 36]. Некоторые из перечисленных способов позволяют вводить объемы в несколько нанолитров, однако они мало пригодны для серийных анализов. Ниже будут рассмотрены только миниатюрные краны-дозаторы как наиболее удобные для практического использования. Системы ввода такого типа в настоящее время выпускаются несколькими фирмами.

Рекомендуется применять дозатор с простой и плавной конфигурацией каналов, поскольку в нем не происходит задержки части пробы. Использование дозаторов с усложненной конфигурацией каналов часто приводит к появлению у пиков больших хвостов из-за диффузионных эффектов и эффектов смешения, особенно если скорости потока меньше 100 мкл/мин. Дозатор простой конструкции с плавной конфигурацией каналов описан, например, в работе [35] (см. также рис. 2-6 [36]).

На рис. 2-7 изображены хроматограммы, полученные на полумикроколонке (1,5 мм (внутр. диам.) x 250 мм) при вводе пробы объемом 1 мкл посредством обычного петлевого до-

Таблица 2-4. Влияние дозатора на эффективность микроколонки (число теоретических тарелок^а)

Тип дозатора	Бензол	Антрацен
Миниатюрный кран-дозатор	9600	10000
Обычный	3700	5200

^а Число теоретических тарелок вычисляли из хроматограмм, изображенных на рис. 2-7, ширину пиков измеряли на уровне 0,607 их высот. Объем пробы составлял 1 мкл. Прочие условия приведены в подписи к рис. 2-7.

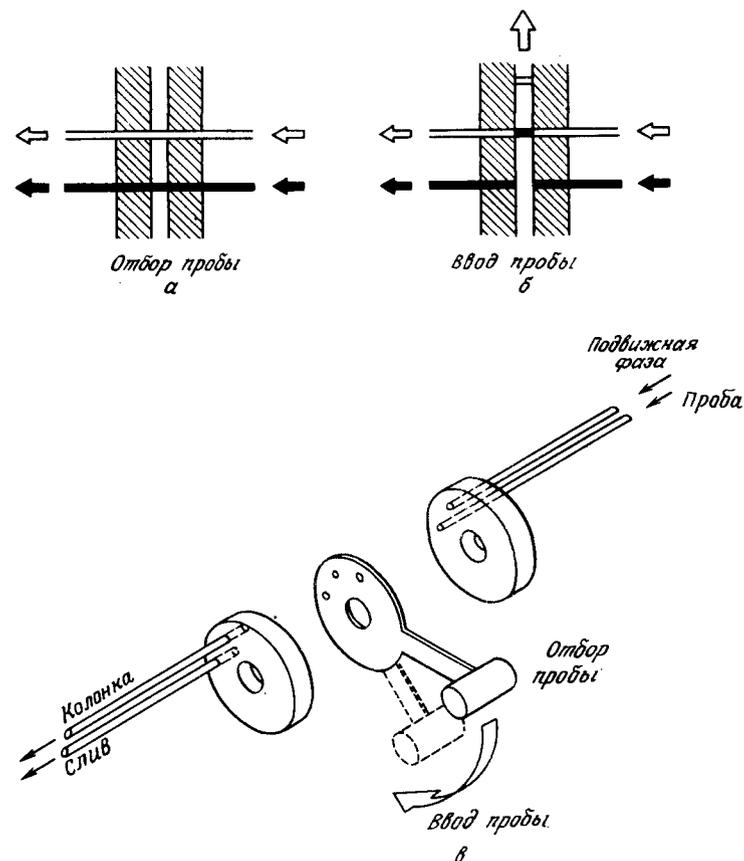


Рис. 2-6. Принцип работы крана-дозатора с внутренней дозирующей петлей и с простым дисковым ротором (а, б). Ввод раствора пробы в колонку путем изменения положения диска (в).

затора JASCO VL-614 и миниатюрного крана-дозатора (JASCO ML-425). В первом случае (хроматограмма а) разделение очень хорошее, во втором (хроматограмма б) - очень плохое из-за неудачно выбранной конструкции дозатора. В табл. 2-4 сравнивается рассчитанная по указанным хроматограммам (рис. 2-7) эффективность разделения, полученная на одной и той же колонке, но с разными дозаторами.

В табл. 2-5 показаны максимальные вводимые объемы для различных пиков при допустимом 5%-ном увеличении объема пика. Следует заметить, что приведенные в этой таблице зна-

Таблица 2-5. Максимальный объем пробы для пиков разного объема^а

Максимальный объем пробы, мкл	Объем пика, мкл
0,3	1
3	10
30	100

^а Предполагается, что проба вводится в виде идеального поршня. Допустимое увеличение объема пика 5%.

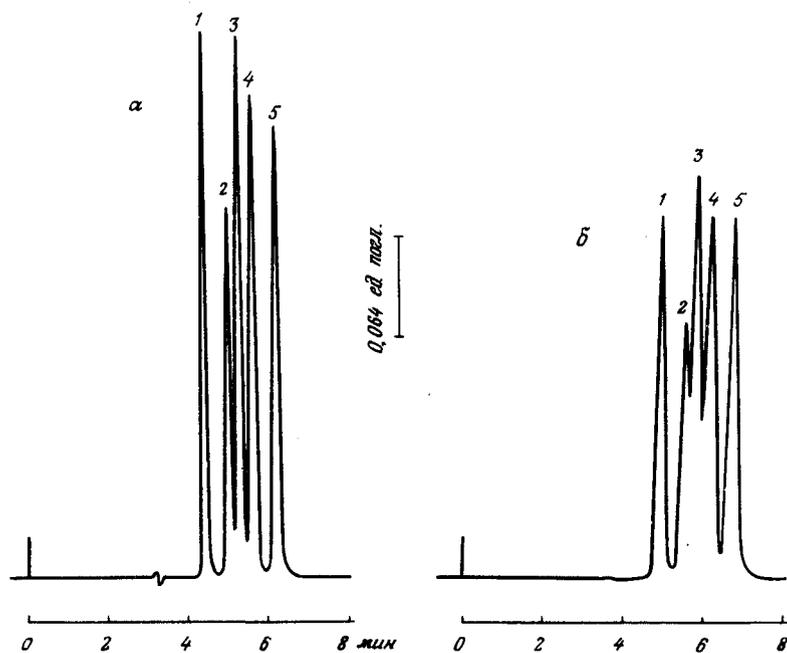


Рис. 2-7. Хроматограммы, полученные при применении различных дозаторов. Хроматограмма (а) получена с применением миниатюрного крана-дозатора, хроматограмма (б) - обычного дозатора. Колонка 1,5 мм x 250 мм; неподвижная фаза MS-Fine Pak Sil C₁₈; подвижная фаза ацетонитрил/вода (90/10); объемная скорость 100 мкл/мин; объем пробы 1 мкл; детектор UVIDEC=100-V; объем кюветы 1 мкл, длина волны 250 нм.

Пики: 1 - бензол (1%), 2 - нафталин (0,05%), 3 - бифенил (0,01%), 4 - флуорен (0,01%), 5 - антрацен (0,001%); растворитель ацетонитрил.

чения справедливы лишь в том случае, если отсутствует адсорбция компонентов неподвижной фазой, что имеет место, например, при эксклюзионной хроматографии. Если проба растворена в растворителе более слабом, чем подвижная фаза, то она вначале концентрируется в головной части колонки и лишь затем начинается ее элюирование. Следовательно, в этом случае вводимый объем может превышать допустимый расчетный, к заметному размыванию пика это не приведет. И, наоборот, если проба растворена в растворителе более сильном, чем подвижная фаза, объем пробы должен строго соответствовать максимально допустимому расчетному. Наконец, если проба растворена в чрезвычайно сильном растворителе, он может принять участие в самом процессе элюирования, в результате чего время удерживания окажется меньше ожидаемого. Поэтому пробу следует растворять в том же растворителе, который выполняет роль подвижной фазы или входит в ее состав, либо, что предпочтительнее, в более слабом растворителе. На рис. 2-8 изображена зависимость между наблюдаемыми объемами пиков и вводимыми объемами для разных растворителей при одном и том же количестве пробы.

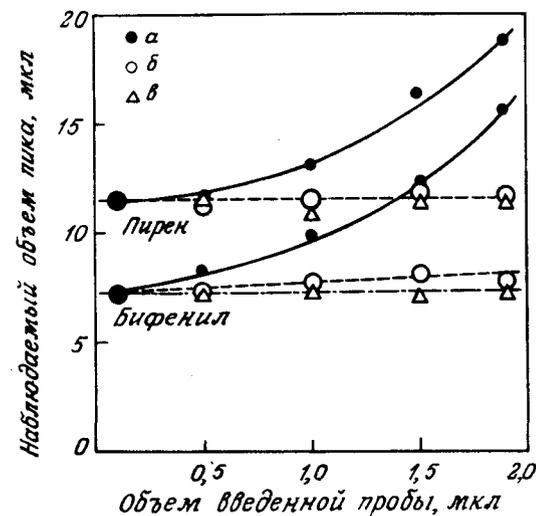


Рис. 2-8. Зависимость наблюдаемых объемов пиков от объема проб при использовании в качестве растворителя ацетонитрила (а); смеси ацетонитрила с водой в соотношении 70/30 (б) и 50/50 (в). Колонка из ПТФЭ 0,5 мм (внутр. диам.) x 150 мм; неподвижная фаза силикагель SC-01, модифицированный октадецилсилианом (ОДС).

На рис. 2-9 показано влияние вводимого объема на эффективность разделения методом микро-ВЭЖХ на колонке размером 0,25 мм (внутр. диам.) x 98 мм [37]. Проба растворялась в более сильном растворителе. Для соединений с $k' > 2$ наблюдалось небольшое уменьшение эффективности колонки, даже если вводимый объем составлял всего 0,05 мкл. Следует также заметить, что, поскольку объем пика пропорционален

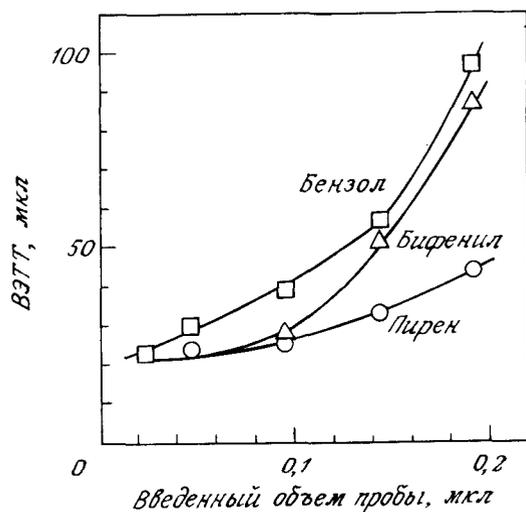


Рис. 2-9. Зависимость эффективности колонки от объема пробы. Колонка 0,25 мм (внутр. диам.) x 98 мм; подвижная фаза ацетонитрил/вода (70/30); объемная скорость 2,2 мкл/мин.
1 - бензол ($k' = 1,2$); 2 - бифенил ($k' = 2,9$); 3 - пирен ($k' = 7,3$).

объему колонки, максимально допустимый вводимый объем зависит как от диаметра колонки, так и от ее длины.

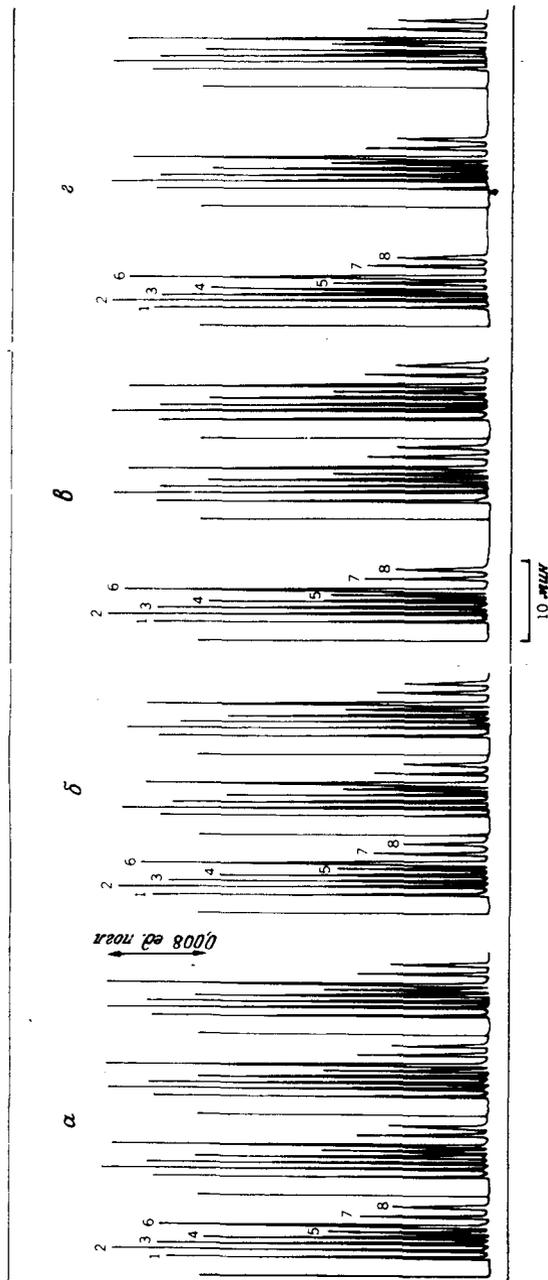
Рис. 2-10 демонстрирует хорошую воспроизводимость вводимых объемов при применении крана-дозатора и характеристик микроколонок [35]. Авторы работы [35] приготовили четыре микро колонки и на каждой из них получили по три-четыре хроматограммы. На одной из этих колонок они выполнили последовательно 15 замеров. Как выяснилось, относительное стандартное отклонение для высот пиков составляло всего 0,6%, несмотря на очень малый вводимый объем (0,02 мкл). Миниатюрный кран-дозатор ML-422 (JASCO) в сочетании с микроколонкой внутренним диаметром 0,25 мм дает минимальное размывание пиков.

2.3.5. Объем ячейки детектора

Для эффективного обнаружения узких пиков, выходящих из колонок малого диаметра, необходим детектор с достаточно малым объемом рабочей ячейки.

Если в ячейке детектора происходит полное перемешивание потока, вариацию детектора σ_d^2 в единицах объема можно выразить следующим образом:

Рис. 2-10. Воспроизводимость вводимых объемов при использовании крана-дозатора. Колонки (а - г) 0,25 мм (внутр. диам.) x 10 мм, кварцевое стекло; неподвижная фаза силикагель SC-01 (5 мкм), модифицированный ОДС; подвижная фаза ацетонитрил/вода (70:30); объемная скорость 3 мкл/мин; детектор UVIDEC-100-111, длина волны 254 нм. Показаны хроматограммы, полученные в результате нескольких (трех или четырех) вводов одинаковых объемов проб (0,02 мкл) состава бензол (1), нафталин (2), бифенил (3), флуорен (4), фенантрен (5), антрацен (6), флуорантен (7), пирен (8).



$$\sigma_d^2 = V_d^2 \quad (18)$$

где V_d - объем ячейки детектора. При ламинарном потоке вклад детектора определяется выражением

$$\sigma_d^2 = V_d^2/12 \quad (19)$$

Ячейка детектора не может работать как идеальная камера смешения. В действительности происходит лишь частичное перемешивание раствора, вследствие чего реальный вклад ячейки детектора обычно представляет собой нечто среднее между этими двумя предельными ситуациями [13]. С увеличением скорости потока вклад детектора возрастает и приближается к верхнему пределу (V_d^2). Эмпирически установлено, что, если объем интересующего хроматографиста пика V_p превосходит объем ячейки детектора V_d в 10 и более раз, вкладом детектора во внеколоночное размывание пика можно пренебречь [14]. В этом случае даже при полном перемешивании потока в ячейке детектора объем пика возрастает менее чем на 8%.

В табл. 2-6 приведены максимальные объемы ячеек для пиков разных объемов. Так, максимальные объемы ячеек для колонок разных диаметров, но одинаковой длины ($L = 250$ мм), эффективности ($N = 10000$) и пористости ($\epsilon = 0,7$) при $k' = 0$ (неудерживаемый пик) составляют:

d_c , мм	Максимальный объем ячейки, мкл
4,6	10
1,5	1
0,5	0,1

Если используется фотометрический детектор, работающий в УФ и видимой области спектра, то при фиксированном максимальном объеме ячейки важно, чтобы длина пробега луча l_{dc} была как можно большей, иначе можно потерять выигрыш в концентрации в максимуме пика, полученный благодаря уменьшению объема колонки. При максимальной величине l_{dc} чувствительность обнаружения также максимальна, поскольку поглощение пропорционально длине пробега луча. Однако оптическое пропускание быстро снижается с уменьшением апертуры, что приводит к ухудшению линейности и отношения сигнал/шум. Для цилиндрической ячейки с фиксированным объемом длина пробега луча (l_{dc}) обратно пропорциональна квадрату диаметра ячейки d_{dc}^2 :

Таблица 2-6. Максимальный объем ячейки детектора для пиков разного объема^а

Максимальный объем ячейки, мкл	Объем пика, мкл
0,1	1
1	10
10	100

^а При полном перемешивании вклад ячейки детектора в увеличение объема пика составляет 8%.

$$l_{dc} = \frac{4V_d}{\pi d_{dc}^2} \quad (20)$$

Эта зависимость для ячеек разных объемов изображена графически на рис. 2-11. Штриховыми линиями показана оптическая апертура (d_{dc}/l_{dc}), изменяющаяся в интервале от 1/10 до 1/5. Этот интервал соответствует обычным значениям апертуры детекторов для ЖХ. Если апертура ниже 1/10, энергия регистрируемого излучения быстро уменьшается и возрастает шум, если же она выше 1/5, длина пробега луча становится слишком малой, в результате чего полезный сигнал резко снижается. Таким образом, практически приемлемые значения диаметра ячейки и длины пробега луча лежат в области, ограниченной штриховыми линиями.

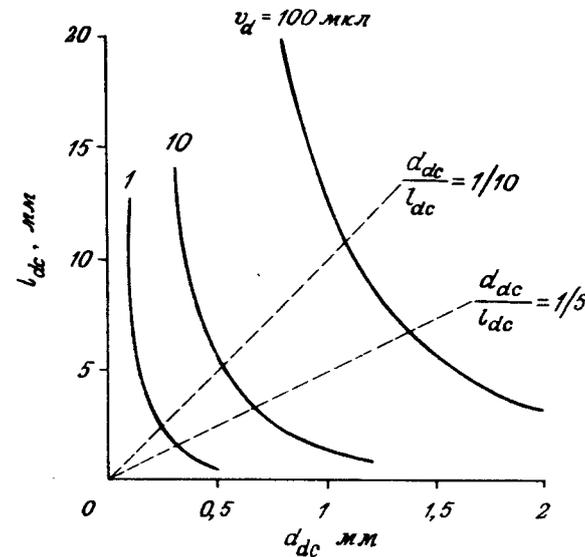


Рис. 2-11. Зависимость длины пробега луча от квадрата диаметра ячейки имеет вид гиперболы. Штриховыми линиями показана оптическая апертура, изменяющаяся от 1/10 до 1/5. Вне этого интервала измеряемая интенсивность излучения быстро уменьшается, или длина пробега луча становится слишком малой; в результате уменьшается линейный динамический диапазон и/или отношение сигнал/шум.

2.3.6. Постоянная времени детектора

Постоянная времени детектора также влияет на размывание пика, а в высокоскоростном анализе она играет определяющую роль. Примем, что к постоянной времени детектора приплюсовывается постоянная времени электрической цепи, изображенной на рис. 2-12. Тогда суммарную постоянную времени можно рассматривать как экспоненциальный коэффициент размывания, вносящий вклад во входной сигнал, имеющий форму гауссианы [11, 38, 39]. Вариацию времени для наблюдаемого пика ($\sigma_{i(ob)}^2$) можно выразить следующим образом:

$$\sigma_{i(ob)}^2 = \sigma_i^2 + \tau^2 \quad (21)$$

где σ_i^2 - вариация пика без учета вклада постоянной времени, а τ - постоянная времени RC-цепи детектора. Если принять, что допустимое внеколоночное размывание пика составляет 1%, то путем подстановки уравнения (21) в уравнение (11) можно вычислить максимальную постоянную времени (τ_{max}). Расчет показывает, что τ_{max} равна примерно 0,14 величины стандартного отклонения исходного пика ($\tau/\sigma_i = 0,14$) или примерно 4% ширины пика в единицах времени. В табл. 2-7 приведены максимальные постоянные времени для пиков с различными временами удерживания.

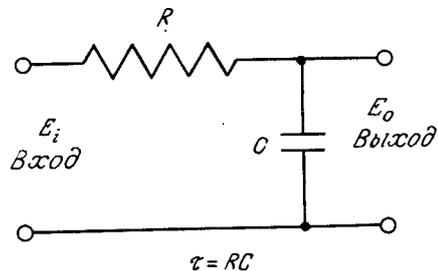


Рис. 2-12. Электрическая цепь, выполняющая роль фильтра, уменьшает высокочастотные шумы на выходе детектора и в то же время служит причиной размывания пика во времени.

2.3.7. Соединительные трубки

Как было показано выше, из микро-колоночной высокоэффективной жидкостной хроматографической системы следует устранить даже самые небольшие мертвые объемы. Для достижения максимальной эффективности разделения на микроколоночке размеры соединительных трубок также необходимо по возможности уменьшить.

Таблица 2-7. Максимальные значения постоянной времени детектора (τ_{max}) для пиков с различными временами удерживания^a

Время удерживания, с	Число теоретических тарелок N		
	5000	10000	20000
6	0,013	0,009	0,006
60	0,13	0,09	0,06
180	0,38	0,26	0,19

^a Допустимое увеличение ширины пика 1%.

Вклад дисперсии ламинарного потока в вариацию пика σ_{pi}^2 в длинной прямой трубке вычислен в работе Тейлора [25, 26]. Этот вклад пропорционален четвертой степени внутреннего радиуса трубки, ее длине и объемной скорости. Для расчета вариации пика в открытой (безнасадочной) колонке при заданной высоте, эквивалентной теоретической тарелке, можно воспользоваться уравнением Голяя - Тейлора [27]:

$$H = \frac{2D_M}{u} + \frac{r_0^2 u}{24D_M} \quad (22)$$

где D_M - коэффициент молекулярной диффузии в подвижной фазе, r_0 - внутренний радиус трубки, u - линейная скорость подвижной фазы. Поскольку высота, эквивалентная теоретической тарелке, для трубки равна $l_1 / (\pi r_0^2 l_1 / \sigma_{pi}^2)^2$, то вариацию пика можно выразить следующим образом:

$$\sigma_{pi}^2 = \pi^2 r_0^4 l_1 H \quad (23)$$

Подставим в это уравнение значение H из уравнения (22) и заменим u на $F/\pi r_0^2$. Тогда

$$\sigma_{pi}^2 = \frac{2\pi^3 D_M r_0^6 l_1}{F} + \frac{\pi r_0^4 l_1 F}{24D_M} \quad (24)$$

Коэффициент молекулярной диффузии D_M в жидкости очень мал, обычно не превышает $1 \cdot 10^{-5}$ см²/с, внутренний радиус трубки также невелик ($< 2,5 \cdot 10^{-2}$ см), поэтому первым членом в уравнении (24) можно пренебречь. Следовательно,

$$\sigma_{pt}^2 = \frac{\pi r_0^4 l_i F}{24 D_M} \quad (25)$$

где вариация пика σ_{pt}^2 пропорциональна четвертой степени внутреннего радиуса трубки r_0 , длине трубки l_i и объемной скорости подвижной фазы F .

Таким образом можно вычислить вклад соединительной трубки в объем пика. Чтобы упростить расчет, перепишем уравнение (25) еще раз с учетом того, что $\sigma_{pt}^2 = (V_{pt}/4)^2$, а $S_t = \pi r_0^2$ (площадь сечения). В результате получим следующее выражение:

$$V_{pt}^2 = \frac{2 S_t^2 l_i F}{3 \pi D_M} \quad (26)$$

Приняв, что за счет вклада соединительной трубки объем наблюдаемого пика увеличивается на 3%, вычислим необходимую площадь сечения трубки и ее длину. Подставим уравнение (26) в уравнение (11):

$$(1,03)^2 = 1 + \frac{2 S_t^2 l_i F}{3 \pi D_M V_p^2} \quad (27)$$

В результате получим:

$$S_t^2 l_i \cong 0,287 D_M V_p^2 / F \quad (28)$$

Для $V_p = 1 \cdot 10^{-2}$ см³ и $F = 1,67 \cdot 10^{-3}$ см³/с, что соответствует типичному объему пика, элюирующегося первым, и объемной скорости, обычно применяемой в полумикро-ВЭЖХ, приняв $D_M = 1 \cdot 10^{-5}$ см²/с, получим

$$S_t^2 l_i = 1,72 \cdot 10^{-7} \quad (29)$$

Для $V_p = 1,0 \cdot 10^{-3}$ см³ и $F = 1,67 \cdot 10^{-4}$ см³/с (значения, типичные для микро-ВЭЖХ), приняв $D_M = 1 \cdot 10^{-5}$ см²/с, получим

$$S_t^2 l_i = 1,72 \cdot 10^{-8} \quad (30)$$

Если внутренний диаметр соединительной трубки равен $1 \cdot 10^{-3}$ см, то ее максимально допустимая длина должна быть следующей:

$$l_{t(\max)} = 28 \text{ см для полумикроколонки}$$

$$l_{t(\max)} = 2,8 \text{ см для микроколонки.}$$

Если же внутренний диаметр соединительной трубки равен $5 \cdot 10^{-4}$ см, ее максимальная длина для рассмотренной выше микроколонки должна составлять около 45 см.

Следует отметить, что если в микро-ВЭЖХ используется обычная соединительная трубка внутренним диаметром 0,25 мм, то ее максимально допустимая длина равна $1/(2,5)^4$ найденных выше величин, т. е. 0,7 см для полумикроколонки и 0,07 см для микроколонки. Очевидно, что в реальных условиях трубками такой длины пользоваться невозможно.

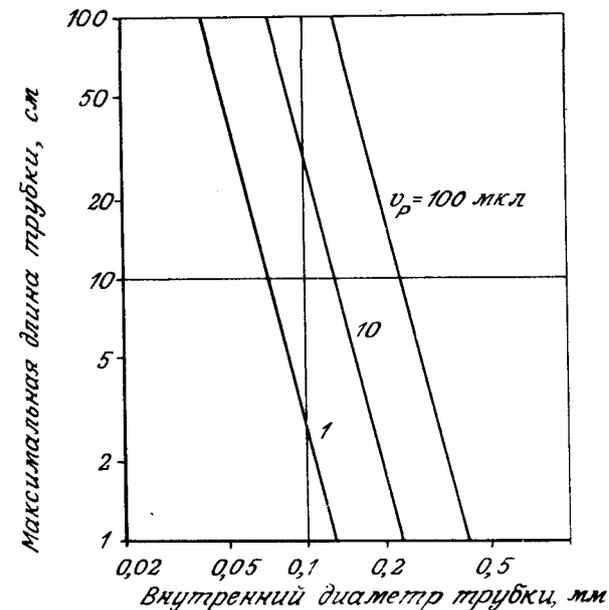


Рис. 2-13. Максимальная длина и диаметр соединительной трубки при допустимом 3%-ном размывании пика для пиков разного объема (V_p). Для пиков объемом 100, 10 и 1 мкл объемные скорости принимаются равными соответственно 1000, 100 и 10 мкл/мин.

На рис. 2-13 изображена зависимость между максимальной длиной и внутренним диаметром соединительной трубки при 3%-ном вкладе трубки в объем различных пиков. Как видно из рисунка, в микро-ВЭЖХ для соединения узла ввода пробы, колонки и детектора необходима трубка, внутренний диаметр которой ни в коем случае не должен превышать 0,1 мм. Вполне пригодна для этой цели трубка с внутренним диаметром 0,05 мм. Ранее было предложено присоединять колонку непосредственно к детектору и узлу ввода пробы [7, 33]. Однако соединительные трубки обеспечивают большую гибкость системы, поэтому их использование целесообразно даже в микро-ВЭЖХ (для полумикроколонок необходимыми соединительные трубки внутренним диаметром не более 0,1 мм, для микроколонок - соединительные трубки внутренним диаметром не более 0,05 мм). Разумеется, эти трубки должны быть как можно короче и даже небольшие мертвые объемы в фитингах недопустимы. В табл. 2-8 указана максимально допустимая длина трубок для пиков разных объемов.

Таблица 2-8. Максимальная длина соединительной трубки (см) для пиков различного объема^а

Объем пика, мкл	Объемная скорость, мкл/мин	Внутренний диаметр трубки, мм		
		0,25	0,1	0,05
1	10	0,07	2,8	45
10	100	0,7	28	450
100	1000	7	280	4500

^а Допустимое увеличение ширины пика 3%.

Необходимо подчеркнуть, что приведенные выше расчеты справедливы только для длинных прямых трубок и что вклад изогнутых трубок, которые обычно используются в установках для ВЭЖХ, значительно меньше, особенно при большом диапазоне линейных скоростей [1, 17, 18, 22-24, 40]. Снижение размывания пика обусловлено наличием внутренних радиальных перемешиванием. В случае ламинарного потока в прямой трубке радиальное перемешивание происходит только в результате диффузии компонентов пробы в подвижной фазе. На рис. 2-14 представлены значения вариаций пика для прямой и спиральной трубки при различных скоростях подвижной фазы.

2.4. УЗЛЫ АППАРАТУРЫ ДЛЯ ВЭЖХ, СОВМЕСТИМЫЕ С ПОЛУМИКРО- И МИКРОКОЛОНКАМИ

Насосы, узлы ввода пробы и детекторы для ВЭЖХ, совместимые с полумикро- и микроколонок, в настоящее время выпускаются многими фирмами [41, 42].

Имеющиеся в продаже насосы для ВЭЖХ можно подразделить на два типа: циклического действия и шприцевые. В настоящее время большее распространение получили первые, поскольку они удобны в эксплуатации и позволяют подавать в колонку неограниченное количество элюента. Обычные для таких насосов диапазоны скоростей от 10 до 1000 мкл/мин и от 0,1 до 10,0 мл/мин, поэтому они пригодны для полумик-

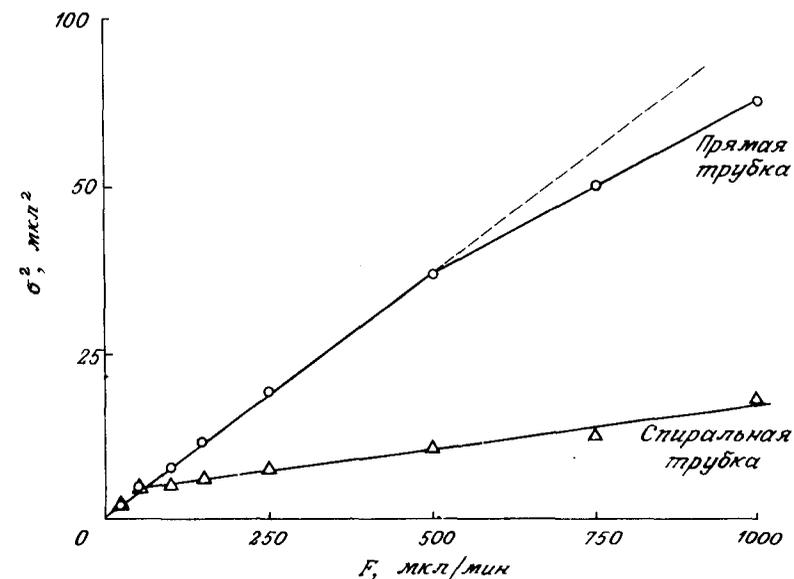


Рис. 2-14. Вклад в вариацию пика спиральной трубки существенно меньше, чем прямой. Показана зависимость вклада спиральной (0,1 мм (внутр. диам.) x 1000 мм) и прямой трубки таких же размеров от объемной скорости. Дозатор ML-425 с дозирующей петлей объемом 1 мкл; детектор UVIDEC-100-V с кюветой объемом 1 мкл; проба раствор пирена 32 нг/мкл. Трубки непосредственно присоединялись к дозатору и детектору системы с известной вариацией. Для вычисления вариаций трубок измеряли ширину пика на уровне 0,607 его высоты и вычитали вариацию системы для каждого значения объемной скорости.

ро-, обычной и полупрепаративной ВЭЖХ, а также высокоскоростного хроматографического анализа, где подвижные фазы перемещаются по колонке с большой линейной скоростью.

Шприцевые насосы применялись на ранних стадиях развития жидкостной хроматографии в 1960-х и в начале 1970-х гг. Объем насосов составлял 200-500 мл. В настоящее время сконструированы насосы объемом 0,5-50 мл, которые используются при относительно малых объемных скоростях. С помощью шприцевых насосов удается получить поток элюента, совершенно свободный от пульсации. Однако вследствие ограниченного объема эти насосы не обеспечивают подачу элюента во всем диапазоне объемных скоростей, необходимом для обычных колонок. Как правило, скорость подачи элюента для таких насосов колеблется в интервале порядка 1-2 мл/мин.

Имеющиеся в продаже детекторы, совместимые с полумикро- и микроколонами, принадлежат только к одному типу - это УФ-детекторы. Удобны в эксплуатации детекторы, конструкции которых позволяют легко менять измерительную кювету. Благодаря этому можно в одном детекторе применять кювету объемом 1 мкл с длиной пробега луча 5 мм, обычную кювету на 8 мкл с длиной пробега 10 мм и препаративную кювету того же объема с длиной пробега 1 мм. Постоянную времени детектора также можно изменять, например от 1 до 0,05 с.

Несколько фирм производят миниатюрные краны-дозаторы. Все они снабжены внутренней дозирующей петлей объемом 0,02-1 мкл. В дозаторах такого типа обычно нельзя изменить дозируемый объем путем частичного заполнения петли из микрошприца. Если же такое изменение необходимо, то следует иметь несколько дозирующих петель разного объема.

В полумикро-ВЭЖХ в качестве соединительных коммуникаций можно использовать трубки из нержавеющей стали внутренним диаметром 0,1 мм и наружным диаметром 1/32 - 1/16 дюйма (0,8 - 1,6 мм). Для их соединения пригодны обычные фитинги. В микро-ВЭЖХ также получили распространение трубки из кварцевого стекла внутренним диаметром 0,05 мм.

Если вы собираетесь включить в свою микро- или полумикросистему ВЭЖХ имеющиеся в продаже стандартные узлы, то обратите особое внимание на способ их присоединения, чтобы избежать внеколоночного размывания пиков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Horvath C.G., Preiss B.A., Lipsky S.R. Anal. Chem. 1967, 39, 1422.
2. Horvath C.G., Lipsky S.R. Anal. Chem. 1969, 41, 1227.
3. Ishii D., Sakurai K. "Tokyo Conference of Applied Spectrometry", Tokyo, Japan, October 1973, abstracts 1B05, p. 73.
4. Ishii D., Asai K., Hibi K., Jonokuchi T., Nagava M. J. Chromatogr. 1977, 144, 157.
5. Ishii D., Hibi K., Asai K., Jonokuchi T. J. Chromatogr. 1978, 151, 147.
6. Scott R.P.W., Kucera P. J. Chromatogr. 1976, 125, 251.
7. Scott R.P.W., Kucera P. J. Chromatogr. 1979, 169, 51.
8. Karasek F.W. Research/Development 1977, Jan p. 42.
9. Knox J.H. J. Chromatogr. Sci. 1977, 15, 352.
10. Saito M., Waka A., Hibi K., Takahashi M. Industrial Research/Development, 1983, Apr, p. 102.
11. Sternberg J.C. Advan. Chromatogr. 1966, 2, 205.
12. Scott R.P.W., Kucera P. J. Chromatogr. Sci. 1971, 9, 641.
13. Martin M., Eon C., Guiochon G. J. Chromatogr. 1975, 108, 229.
14. Kirkland J.J., Yan W.W., Stoklosa H.J., Dilks C.H., Jr. J. Chromatogr. Sci. 1977, 15, 303.
15. Coq B., Cretier G., Rocca J.L. J. Chromatogr. 1979, 178, 41.
16. DiCesare J.L., Dong M.W., Atwood J.G. J. Chromatogr. 1981, 217, 369.
17. Golay M.J.E., Atwood J.G. J. Chromatogr. 1979, 186, 353.
18. Atwood J.G., Golay M.J.E. J. Chromatogr. 1981, 218, 97.
19. Lauer H.H., Rozing G.P. Chromatographia 1981, 14, 641.
20. Wright N.A., Villalanti D.C., Burke M.F. Anal. Chem. 1982, 54, 1735.
21. Hupe K.P., Jonker R.J., Rozing G. J. Chromatogr. 1984, 285, 253.
22. Katz E.D., Scott R.P.W. J. Chromatogr. 1983, 268, 169.
23. Hofmann K., Halasz I. J. Chromatogr. 1979, 173, 211.
24. Hofmann K., Halasz I. J. Chromatogr. 1980, 199, 3.
25. Taylor G. Proc. Roy. Soc. London, Ser. A 1953, 219, 186.
26. Taylor G. Proc. Roy. Soc. London, Ser. A 1954, 225, 473.
27. Golay M.J.E. In Goates V.J., Noebels H.J., Fagerson I.S. Eds; "Gas Chromatography 1957 (Lansing Symposium)", Academic Press: New York, 1958; p. 1.
28. Colin H., Martin M., Guiochon G. J. Chromatogr. 1979, 185, 79.
29. Harvey M.C., Stearns S.D. J. Chromatogr. 1983, 21, 473.
30. Coq B., Cretier G., Rocca J.L. J. Chromatogr. 1981, 19, 1.
31. Hirata Y., Novothy M. J. Chromatogr. 1979, 186, 521.
32. Tsuda T., Novothy M. Anal. Chem. 1978, 50, 632.
33. Yang F.J. J. Chromatogr. 1982, 236, 265.
34. McGuffin V.L., Novothy M. Anal. Chem. 1983, 55, 580.
35. Takeuchi T., Ishii D. J. High Resolut. Chromatogr./Chromatogr. Commun. 1981, 4, 469.
36. Ishii D., Konishi H.U.S. Patent 4 346 610, 1982.
37. Takeuchi T., Ishii D. J. Chromatogr. 1981, 213, 25.

38. Schmauch L.J. Anal. Chem. 1959, 31, 225.
39. McWilliam I.G., Bolton H.C. Anal. Chem. 1969, 41, 1755.
40. Tijssen R. Separ. Sci. Technol. 1978, 13, 681.
41. International Chromatography Guide, J. Chromatogr. Sci. 1986, 24, IG.
42. 1986 Buyers Guide Edition, International Laboratory: Fairfield, Connecticut 1986.

3. МИКРОКОЛОНКИ

Д. Исии, Т. Такеучи, А. Уода*

3.1. ВВЕДЕНИЕ

Как уже говорилось в гл. 1, микроколонки можно подразделить на несколько типов в зависимости от их размеров и типа насадки. В данной главе мы рассмотрим характеристики открытых (безнасадочных) и насадочных капиллярных колонок внутренним диаметром 0,1 - 0,5 мм, объемы которых в 100 - 2000 раз меньше объема обычной колонки для ВЭЖХ внутренним диаметром 4,6 мм и длиной 250 мм. В этой главе мы также обсудим, какое оборудование необходимо для работы с такими колонками, каковы способы их изготовления, в чем заключается их предварительная подготовка и рассмотрим целесообразность применения в микро-ВЭЖХ необычных подвижных фаз.

3.2. НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

3.2.1. Насосы

Чтобы время удерживания не менялось с изменением радиуса колонки, объемную скорость нужно регулировать таким образом, чтобы линейная скорость оставалась постоянной. Следовательно, для микро-ВЭЖХ необходим насос, обеспечивающий объемную скорость от 1 до 10 мкл/мин. Как уже говорилось в гл. 2, микронасосы высокого давления в настоящее время выпускаются серийно. В качестве насоса в микро-ВЭЖХ может также использоваться газоплотный шприц с механической подачей, способный выдерживать давление около 70 бар. Объемная скорость, обеспечиваемая таким насосом, зависит от размеров шприца, и скорости менее 1 мкл/мин поддерживаются с достаточно высокой точностью.

*D. Ishii, T. Takeuchi, Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya 464, Japan. A. Wada, Japan Spectroscopic Company, Ltd., Nachioji City, Tokyo 192, Japan.

3.2.2. Дозаторы

Вводимый объем следует выбирать очень осторожно, соотносясь с размерами колонки. Для колонки внутренним диаметром 0,25 мм и длиной 100 мм его следует уменьшить примерно до 0,02 мкл (см. гл. 2). Такой маленький объем можно вводить с достаточно хорошей воспроизводимостью (например, посредством миниатюрного крана-дозатора ML-422 фирмы JASCO). Изменение вводимого объема осуществляется путем изменения диаметра отверстия в диске ротора. Упомянутый дозатор снабжается несколькими дисками с различным дозируемым объемом. Краны-дозаторы типа Rheodyne 7520* и EYELA 5001** (Япония), основаны на том же принципе, что и дозатор ML-422. Следует заметить, что кран-дозатор EYELA 5001 может обеспечить ввод шести различных объемов (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 и 1 мкл).

Соединительная трубка между колонкой и дозатором также играет важную роль. Чтобы не увеличивать внеколоночное размытие пиков, следует пользоваться трубками внутренним диаметром не более 50 - 70 мкм. Упомянутые выше дозаторы рассчитаны на подключение к хроматографической системе с помощью трубок наружным диаметром 1/16 дюйма (1,6 мм). Трубки столь малого внутреннего диаметра промышленностью не выпускаются. Однако для соединения колонки с дозатором пригодны трубки из нержавеющей стали наружным диаметром 1/16 дюйма (1,6 мм) с вкладышем из кварцевого стекла или нержавеющей стали, имеющим достаточно узкий внутренний канал. Правда, изготовить их довольно трудно.

3.2.3. Детекторы

В ВЭЖХ применяются детекторы разных типов. Наибольшее распространение получили спектрофотометрические (для УФ- и видимой области спектра) и флуоресцентные, а также электрохимические детекторы и рефрактометры. Возможности, обеспечиваемые этими детекторами, и проблемы, возникающие при работе с ними, рассмотрены в гл. 4 - 6. Здесь же мы лишь кратко остановились на использовании в микро-ВЭЖХ спектрофотометрических детекторов УФ- и видимой области спектра.

Кюветы спектрофотометрических детекторов можно подраз-

* 6815 So. Santa Rose Ave., Cotati, CA 949228, USA.

** Muromachi 4-2, Nihonbashi, Chuo-ku, Tokyo, Japan.

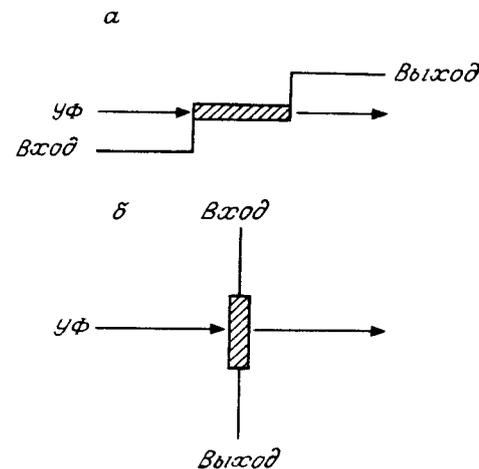


Рис. 3-1. Проточные кюветы с параллельными (а) и пересекающимися (б) потоками.

делить на два типа: кюветы с параллельными и с пересекающимися потоками (рис. 3-1). Кюветы первого типа позволяют достигнуть максимальной чувствительности, однако изготовить такую микрокювету сложно. Кюветы второго типа изготавливают из кварцевого цилиндра, это проточная кювета, и мертвый объем соединительной трубки между колонкой и нею легко свести к минимуму. Диаметр кюветы с пересекающимися потоками близок к диаметру хроматографической колонки. Эта конструкция менее универсальна, но зато в данном случае кюветой может служить выходной конец хроматографической колонки, изготовленной из кварцевого стекла [1].

В микро-ВЭЖХ можно использовать также многоканальный спектрофотометрический детектор УФ- и видимого диапазона с фотодиодной гребенкой. Он позволяет сократить число оптических узлов, например линз или зеркал, и уменьшить расстояние между источником света и кюветой или между кюветой и дифракционной решеткой [2].

3.2.4. Аппаратура для градиентного элюирования

Градиентное элюирование в ВЭЖХ позволяет существенно уменьшить продолжительность и повысить селективность анализа. Авторы работ [3, 4] исследовали пригодность этого метода для микро-ВЭЖХ [3, 4]. Хотя микронасосы, позволяющие осуществить градиентное элюирование, выпускаются се-

рийно, воспроизводимость градиентного элюирования при объемных скоростях меньше нескольких десятых микролитра в минуту оказалась неудовлетворительной. Наиболее эффективным в микро-ВЭЖХ оказался метод градиентного элюирования с использованием смесительной камеры малого объема. В этом методе градиентный профиль изменяется экспоненциально во времени t , в зависимости от объемной скорости F и объема смесительной камеры V_m [3] в соответствии с уравнением

$$x = a - (a - x_0) \exp\left(\frac{-Ft}{V_m}\right) \quad (1)$$

где a - концентрация поступающего раствора; x_0 - исходная концентрация раствора в смесительной камере. На рис. 3-2 показана система градиентного элюирования со смесительной камерой. Эта система обеспечивает градиентное элюирование при низких объемных скоростях (менее 10 мкл/мин).

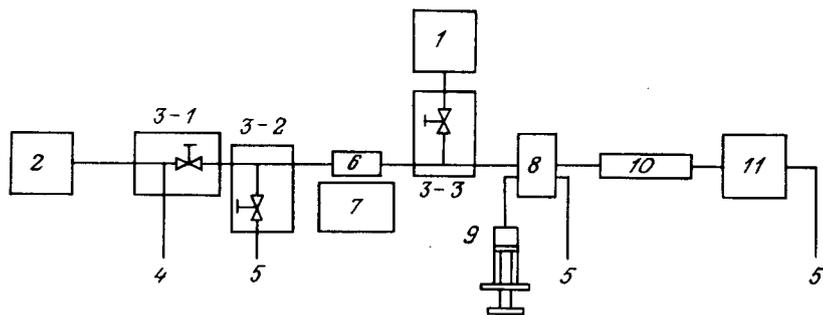


Рис. 3-2. Блок-схема системы для градиентного элюирования.

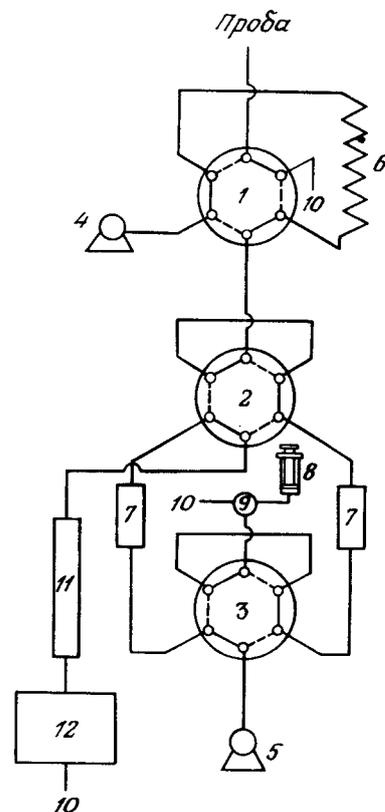
1 - насос А (модель 590 Waters Associates, 34 Maple Street, Milford, MA 01757, USA); 2 - насос В (микронасос LDC/Milton Roy, P.O. Box 10235, Rivieri Beach, FL 33404, USA); 3 - трехходовые краны; 4 - поршень; 5 - слив; 6 - смесительная камера; 7 - магнитная мешалка; 8 - миниатюрный кран-дозатор; 9 - шприц; 10 - колонка; 11 - УФ-детектор.

3.3. ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЕ КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ ПРОБЫ НА ПРЕДКОЛОНКЕ

Повышенная чувствительность к массе обнаруживаемого компонента, связанная с миниатюризацией колонки, создает весьма благоприятные условия для анализа микроколичеств веществ, что очень важно при исследовании проб, представляю-

Рис. 3-3. Система концентрирования с предколонкой.

1 - кран-переключатель 1 (Rheodyne 7000); 2 - кран-переключатель 2 (Valco N6W); 3 - кран-переключатель 3 (Rheodyne-7000); 4 - насос (Famic-300S); 5 - насос (LKB-2150); 6 - дозирующая петля; 7 - концентрирующие колонки; 8 - шприц для измерения объема пробы; 9 - трехходовой запорный кран; 10 - слив; 11 - разделительная колонка; 12 - УФ-детектор.



щих особым интерес. Однако, если ввод такой пробы осуществляется краном-дозатором, большая ее часть разрушается, поэтому вводить такого рода пробу, например компоненты плазмы крови, при помощи крана-дозатора нецелесообразно. Эта проблема удовлетворительно решается с помощью предварительного концентрирования пробы на дополнительной колонке, так называемой предколонке. С этой целью аликвотный объем раствора пробы вначале пропускают через микропредколонку. После чего проводят хроматографическое разделение веществ, сконцентрировавшихся в колонке [5]. Интересующие исследователя компоненты можно сконцентрировать на предколонке при надлежащем выборе неподвижной фазы и элюента. Кроме того, данный метод позволяет повысить низкую концентрационную чувствительность микро-ВЭЖХ. Если концентрация

раствора равна 10-7%, то после пропускания через предварительную колонку 1 мл пробы при хорошем выходе анализу подвергнется уже 1 нг вещества.

Хроматографическую систему, в которой предколонка располагается непосредственно перед разделительной, можно собрать, пользуясь краном-переключателем N6W*. На рис. 3-3 изображена такая система, состоящая из двух насосов, трех кранов-переключателей, двух предколонок, разделительной колонки и детектора. Если система содержит две предколонки, на одной из них можно осуществлять концентрирование, а на другой - непосредственно разделение. Чтобы уменьшить размывание полосы пробы на участке между предколонкой и разделительной колонками, для присоединения крана-переключателя следует применять трубки с каналом достаточно малого диаметра. Система с раздельным подключением предколонки и разделительной колонок также приемлема для микро-ВЭЖХ, хотя в этом случае процедура усложняется.

Микропредколонка имеет внутренний диаметр 0,2 - 0,5 мм, длина ее составляет 20 - 30 мм, т. е. она примерно в десять раз меньше разделительной колонки. Заполнять ее следует относительно крупными частицами (15 - 30 мкм), поскольку такая насадка отличается хорошей проницаемостью и позволяет проводить концентрирование при большой скорости потока. Так как система работает при высоком давлении, целесообразно использовать соединительные муфты из нержавеющей стали. Предколонки из ПТФЭ пригодны лишь при давлениях менее 70 бар.

3.4. ХАРАКТЕРИСТИКИ МИКРОКОЛОНОК

Заполнение колонок можно проводить теми же методами, что и в обычной ВЭЖХ, если только входной фитинг колонки способен выдержать достаточно высокое давление. Гидрофобные колонки, например колонки с октадецилсиликагелем (ОДС), можно заполнять вязкостным методом или суспензионным методом с неионным детергентом.

3.4.1. Материал колонки

Колонками для микро-ВЭЖХ служат трубки из ПТФЭ, нержавеющей стали, стекла, кварцевого стекла или трубки из нержавеющей стали, покрытые изнутри стеклом. Наибольшую

*Valco, P.O. Box 55603, Houston, TX 77255, USA.

эффективность дают колонки из кварцевого и обычного стекла благодаря гладкости и химической инертности их внутренней поверхности. Трубки из кварцевого стекла достаточно гибки, что упрощает изготовление из них длинных колонок. Для герметизации трубок из кварцевого стекла выпускаются полиимидные уплотнения, позволяющие работать при высоких давлениях. Если трубка из кварцевого стекла вклеена в трубку из нержавеющей стали, можно использовать фитинги с уплотнениями и соединительными муфтами из нержавеющей стали [6]. Выпускаются также трубки из нержавеющей стали, покрытые изнутри стеклом, внутренние каналы таких трубок могут иметь различные диаметры. Из таких трубок наружным диаметром 1/16 дюйма (1,6 мм) изготавливают колонки, пригодные для соединения со стандартными соединительными муфтами. Это позволяет без труда заполнить колонку и собрать хроматографическую систему, работающую при высоком давлении.

На рис. 3-4 показана хроматограмма, полученная при разделении многоядерных ароматических углеводородов на колонке размером 0,25 мм (внутр. диам.) x 100 мм, заполненной октадецилсиликагелем [7]. Эффективность микроколонок из кварцевого стекла, как показали эксперименты, сравнима с эффективностью обычных колонок.

3.4.2. Высокоскоростная хроматография

Высокоскоростная ВЭЖХ приобретает все большую популярность [8 - 12]. По сравнению с обычными методами она имеет ряд преимуществ: меньшее время анализа, меньшие расходы, возможность анализировать нестабильные соединения. Обычно для высокоскоростного разделения используются короткие колонки, наполненные очень тонкодисперсной насадкой. Одно из преимуществ микро-ВЭЖХ состоит в том, что она позволяет осуществлять высокоскоростное разделение при малых объемных скоростях. Для высокоскоростной микро-ВЭЖХ достаточны объемные скорости порядка 10-50 мкл/мин, которые позволяют получить большинство имеющихся в продаже насосов.

Соединительные трубки и фитинги системы должны быть спроектированы специально для высокоскоростной ВЭЖХ с тем, чтобы уменьшить внеколоночное размывание пиков. На это следует обратить особое внимание, поскольку обычно длина колонки составляет всего 3 - 10 см [6].

Если эффективность разделения на колонке длиной 5 см при линейной скорости 1 см/с достигает 1600 теоретических тарелок, пик неударживаемого компонента элюируется за 5 с,

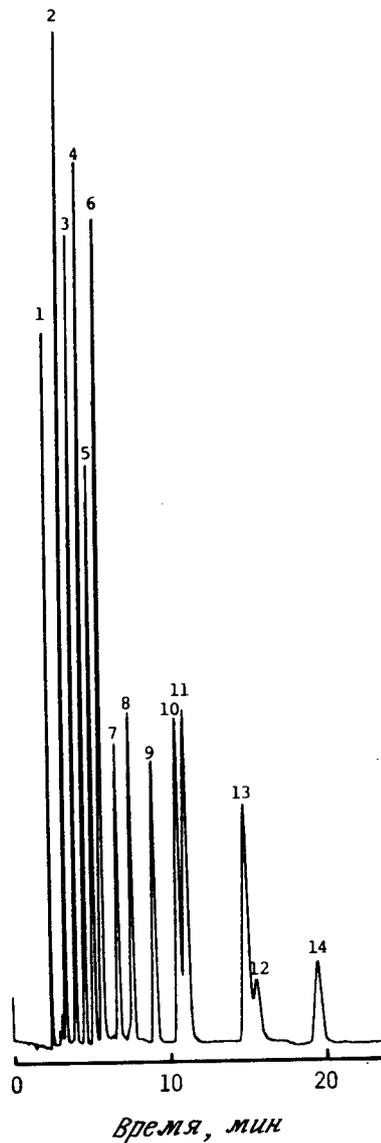


Рис. 3-4. Разделение много-ядерных ароматических углеводородов (ПАУ) на капиллярной колонке из кварцевого стекла. Колонка 0,25 мм (внутр. диам.) x 100 мм; неподвижная фаза ацетонитрил/вода (7/3); объемная скорость 3,3 мкл/мин; детектор УФ, длина волны 254 нм; температура колонки 24°C.

1 - бензол, 2 - нафталин, 3 - бифенил, 4 - флуорен, 5 - фенантрен, 6 - антрацен, 7 - флуорантен, 8 - пирен, 9 - *p*-терфенил, 10 - хризен, 11 - фенилантрацен, 12 - перилен, 13 - 1,3,5-трифенилбензол, 14 - бенз(а)пирен.

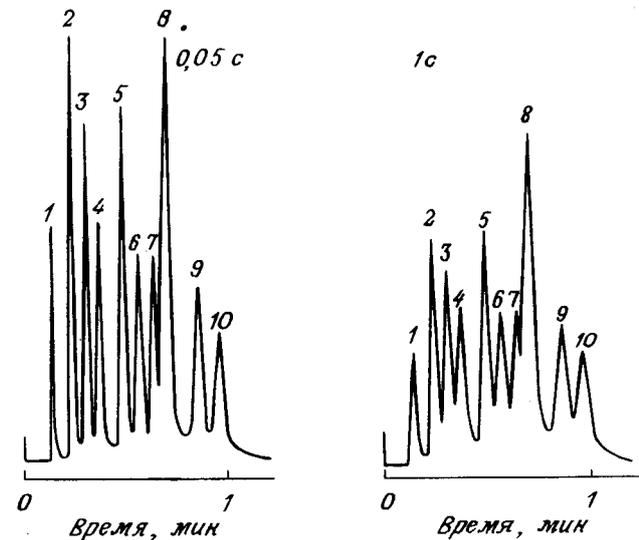


Рис. 3-5. Влияние постоянной времени детектора на эффективность разделения. Колонка 0,34 мм (внутр. диам.) x 50 мм; неподвижная фаза девелосил ODS-3; подвижная фаза ацетонитрил/вода (65/35); объемная скорость 30 мкл/мин; детектор УФ, длина волны 254 нм.

1 - фенол, 2 - бензол, 3 - толуол, 4 - нафталин, 5 - бифенил, 6 - флуорен, 7 - фенантрен, 8 - антрацен, 9 - флуорантен, 10 - пирен.

в УФ- и видимой области, обычно примерно равна 1 с, поэтому узкие пики несколько размываются. При высокоскоростном разделении постоянная времени регистрирующей системы не

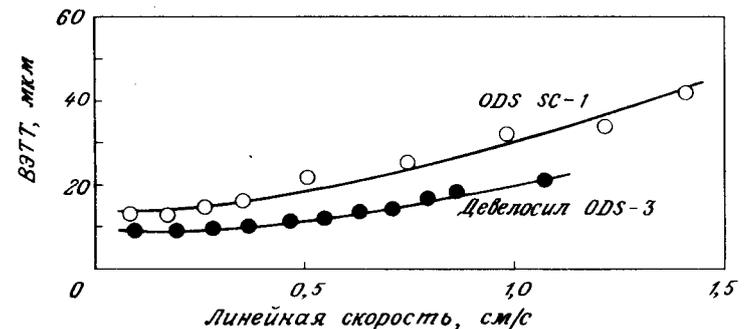


Рис. 3-6. Влияние диаметра частиц на соотношение ВЭТТ и линейной скорости подвижной фазы. Колонка 0,34 мм (внутр. диам.)x100 мм; подвижная фаза ацетонитрил/вода (7:3); проба пирен; постоянная времени детектора 0,04 с.

а ширина его составляет всего 0,5 с. Поэтому необходим достаточно быстродействующий детектор и самописец. Постоянная времени спектрофотометрических детекторов, работающих

должна превышать 50 мс. В настоящее время выпускаются спектрофотометрические детекторы УФ- и видимого диапазона, позволяющие легко изменять постоянную времени.

На рис. 3-5 приведены хроматограммы многоядерных ароматических углеводородов, полученные при разных постоянных времени системы (0,05 и 1 с). Нетрудно заметить, что эти хроматограммы существенно различаются.

На рис. 3-6 изображена зависимость между высотой, эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ), и линейной скоростью подвижной фазы u для колонок, заполненных октадецилсиликагелем с размером зерен 3 и 5 мкм. На колонках с насадкой 3 мкм разделение происходит быстрее. Высокоскоростное разделение многоядерных ароматических углеводородов (14 соединений всего за 2 мин) показано на рис. 3-7.

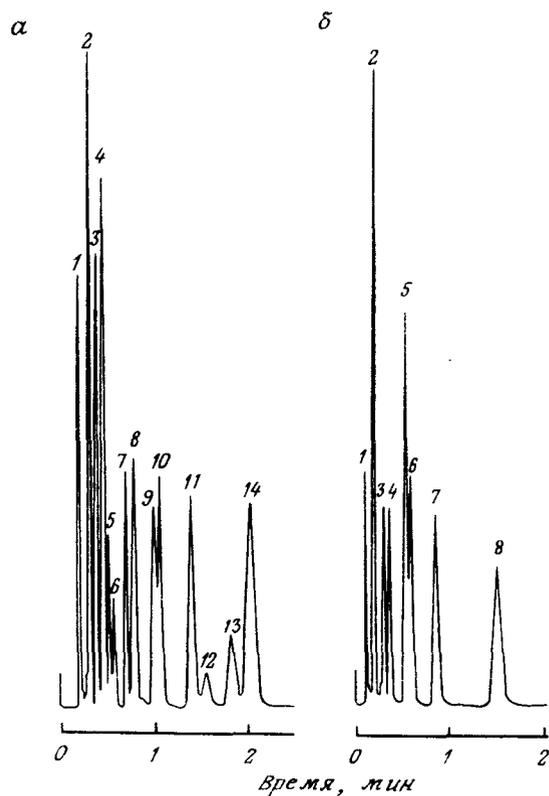


Рис. 3-7. Высокоскоростное разделение многоядерных ароматических углеводородов. Колонка 0,34 мм (внутр. диам.) x 50 мм; неподвижная фаза девелосил ODS-3; подвижная фаза ацетонитрил/вода 7/3 (а), 8/2 (б); давление на входе в колонку 150 кг/см²; объемная скорость 30 (а) и 40 мкл/мин (б); постоянная времени детектора 0,04 с.

а: 1 - бензол, 2 - нафталин, 3 - бифенил, 4 - флуорен, 5 - фенантрен, 6 - антрацен, 7 - флуорантен, 8 - пирен, 9 - л-терфенил, 10 - 9-фенилантрацен, 11 - хризен, 12 - перилен, 13 - бенз(а)пирен, 14 - 1,3,5-трифенилбензол;

б: 1 - бензол, 2 - флуорен, 3 - пирен, 4 - хризен, 5 - 1,3,5-трифенилбензол, 6 - бенз(а)пирен, 7 - бенз(г,и)перилен, 8 - коронен.

3.4.3. Высокоэффективные колонки

Для разделения сложных смесей веществ с близкими временами удерживания следует использовать колонки с большим числом теоретических тарелок. Разделение двух разных веществ может быть выражено формулой:

$$R_s = \frac{\alpha - 1}{4} \sqrt{N_{eff}} \quad (2)$$

где α - коэффициент разделения ($\alpha = k_2'/k_1'$), N_{eff} - эффективное число теоретических тарелок. Из уравнения (2) следует, что если коэффициент разделения α веществ равен, например, 1,013, то эти вещества можно разделить на колонке с 10⁵ эффективных теоретических тарелок, а если $\alpha = 1,004$, то эффективная колонка должна достигать уже 10⁶ эффективных теоретических тарелок.

Микро-ВЭЖХ облегчает применение длинных колонок и позволяет достигнуть высокой эффективности разделения, поскольку общее число теоретических тарелок пропорционально длине колонки. Вихревая диффузия в микроколонке уменьшается; а отвод выделяющегося тепла ускоряется. Особенно удобны благодаря их гибкости, длинные колонки из кварцевого стекла.

Рис. 3-8 демонстрирует зависимость между числом теоретических тарелок и длиной колонки в эксклюзионной хроматографии. При использовании насадки с размером зерна 5 мкм эффективность колонки может составлять 60000 теоретических

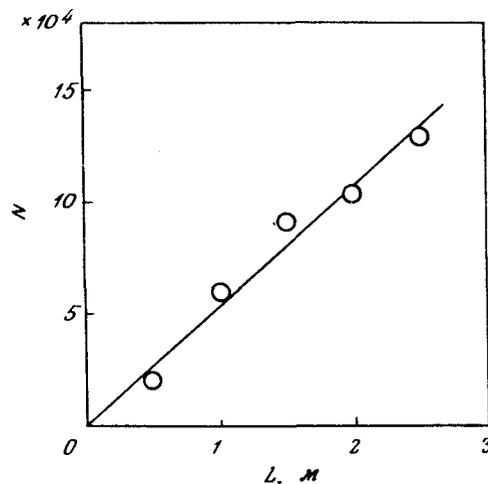


Рис. 3-8. Соотношение между длиной колонки и числом теоретических тарелок. Неподвижная фаза TSK-GEL 3000Н; подвижная фаза тетрагидрофуран (ТГФ); объемная скорость 1,04 мкл/мин; проба бензол.

тарелок на метр [13]. Высокой эффективности разделения удастся достигнуть также в обращенно-фазовой хроматографии на колонках длиной 1 - 2 м [1, 14, 15]. Разделение методом обращенно-фазовой хроматографии на длинной колонке требует большой затраты времени; эксклюзионная хроматография позволяет произвести разделение гораздо быстрее.

На рис. 3-9 приведена хроматограмма, полученная при разделении методом обращенно-фазовой хроматографии смеси полихлорированных бифенилов на колонке размером 0,34 мм (внутр. диам.) x 100 мм, наполненной октадецилсиликагелем.

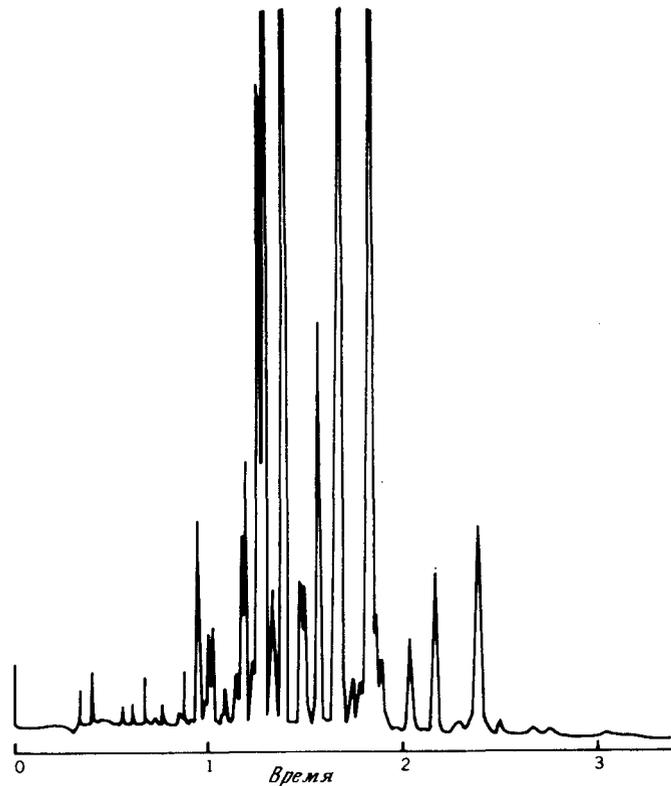


Рис. 3-9. Хроматограмма разделения смеси полихлорированных бифенилов (ПХБ) на микроколонке из кварцевого стекла (внутр. диам. 0,34 мм, длина 1 м). Насос FAMILIC-300, неподвижная фаза SC-01, подвижная фаза ацетонитрил/вода (85/15), давление на входе 80 кг/см², объемная скорость 2,8 мкл/мин, детектор УФ, длина волны 254 нм. Проба 0,29 мкл 1%-ного раствора ПХБ-48 (содержание хлора 48%).

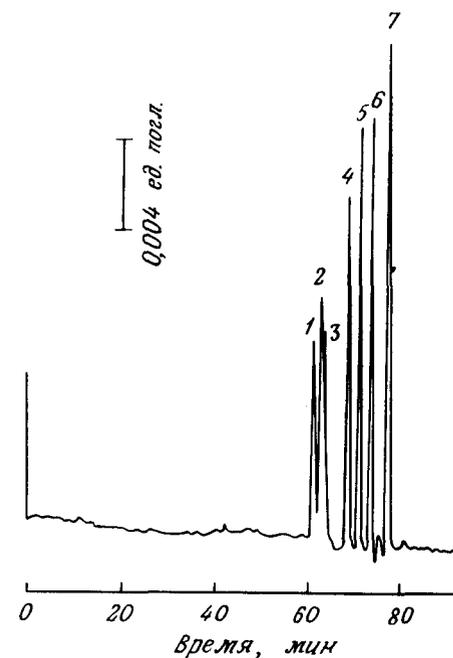


Рис. 3-10. Разделение фталатов методом микро-ВЭЖХ. Колонка 0,35 мм (внутр. диам.) x 142,6 см, неподвижная фаза 1000Н (5 мкм); объемная скорость 1,04 мкл/мин.

1 - диметилфталат, 2 - диэтилфталат, 3 - ди-*n*-пропилфталат, 4 - ди-*n*-бутилфталат, 5 - дигептилфталат, 6 - ди-2-этилгексилфталат, 7 - динонилфталат. Содержание каждого компонента в пробе 0,2%.

Эффективность разделения равна примерно 70 000 теоретических тарелок, однако для полного разделения исследуемой смеси этого недостаточно. На рис. 3-10 изображено разделение смеси фталатов методом эксклюзионной хроматографии на колонке размером 0,35 мм (внутр. диам.) x 143 см. На этой же колонке удалось добиться удовлетворительного разделения эпоксидных и фенолформальдегидных смол (см. гл. 7).

3.4.4. Программирование температуры

Малая теплоемкость микроколонок облегчает программирование температуры [15, 16]. По сравнению с градиентным элюированием программирование температуры требует гораздо менее сложного аппаратного оформления. Достаточно поме-

стить колонку в термостат, температура которого программируется. Для этого можно воспользоваться даже обычным термостатом газового хроматографа. При разделении некоторых термостойких соединений градиентное элюирование удается заменить программированием температуры.

На рис. 3-11 даны хроматограммы *n*-нитробензиловых эфиров жирных кислот, полученные при разделении в изотермическом режиме и в режиме программирования температуры [16]. Нетрудно заметить, что во втором случае продолжительность анализа существенно уменьшается, а чувствительность возрастает.

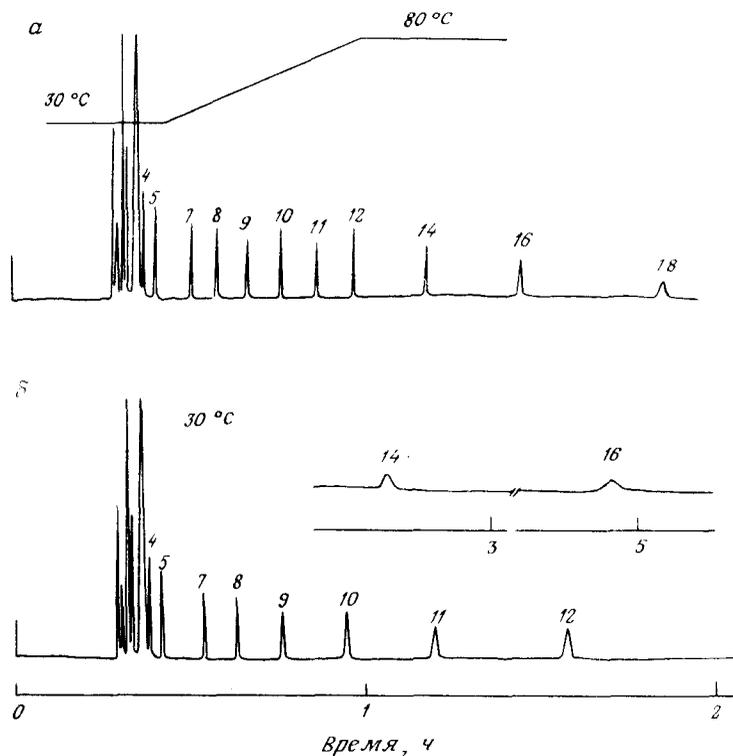


Рис. 3-11. Разделение *n*-нитробензиловых эфиров жирных кислот C_4 - C_{18} при программировании температуры (а) и в изотермическом режиме (б). Колонка 0,2 мм (внутр. диам.) \times 1 м, насадка с размером частиц 3 мкм; подвижная фаза ацетонитрил/вода (90/10); давление 300 кг/см²; детектор УФ, длина волны 254 нм. Номера пиков соответствуют числу атомов углерода в молекуле кислоты.

3.4.5. Применение необычных подвижных фаз

Микро-ВЭЖХ облегчает применение токсичных, дорогостоящих, горючих или экзотических подвижных фаз. В частности, рядом авторов изучена возможность применения в качестве таковых низкомолекулярных алканов [17], диоксида углерода [18] и дейтерированных растворителей [19, 20]. Последние могут использоваться при сочетании ВЭЖХ с ИК- или ЯМР-спектроскопией. Низкомолекулярные алканы и диоксид углерода отличаются малой вязкостью, и поэтому с их помощью можно осуществить высокоскоростное разделение. Однако, чтобы такие низкокипящие растворители могли служить подвижными фазами, необходимо модифицировать всю систему, поскольку она должна выдерживать давление, превышающее давление их паров. С низкокипящими растворителями в качестве подвижной фазы исследуемая проба в зависимости от выбранной температуры разделяется в режиме либо жидкостной хроматографии (ЖХ), либо сверхкритической флюидной хроматографии (СФХ). Критическая температура для диоксида углерода (ок. 31°C) близка к комнатной, что позволяет на одном и том же приборе проводить разделение в режиме как ЖХ, так и СФХ. Характеристики хроматографического разделения с применением низкокипящих растворителей рассмотрены в гл. 7.

3.5. ОТКРЫТЫЕ (БЕЗНАСАДОЧНЫЕ) КАПИЛЛЯРНЫЕ КОЛОНКИ

3.5.1. Введение

Капиллярные колонки, впервые предложенные Голеем [21, 23], вскоре получили широкое распространение. В ГХ открытые капиллярные колонки отличаются высокой проницаемостью и позволяют получить больше теоретических тарелок на единицу времени и на единицу перепада давления, чем насадочные колонки. На высокоэффективных открытых капиллярных колонках можно осуществлять разделение сложных смесей, плохо поддающихся разделению на обычных насадочных колонках. Естественно, что делались попытки использовать открытые капиллярные колонки и в жидкостной хроматографии.

Эффективность разделения в режиме ЖХ на открытых капиллярных колонках тех же размеров, что и применявшиеся в ГХ, оказалась невелика. Это объясняется малой скоростью диффузии в жидкой подвижной фазе [24-28]. Теоретически было показано, что для ЖХ необходимы колонки с каналом меньшего диаметра. Группа Исии [26] впервые продемонстри-

рвала пригодность для ЖХ открытых капиллярных колонок внутренним диаметром 60 мкм.

В работе Тейлора [27] подробно рассмотрена диффузия вещества в ламинарном потоке, проходящем по прямой трубке. Поскольку диффузия молекул вещества в жидкости в этих условиях происходит весьма медленно, необходимы очень узкие трубки. В результате исследователи начали обдумывать возможность изменения характера ламинарного потока в открытой капиллярной колонке. В частности, были исследованы характеристики колонки с турбулентным потоком [28], с потоком, разделенным воздушными перегородками [29, 30], спиральные колонки [31] и колонки, изготовленные из деформированных или волнообразных трубок [32], а также электроосмотический поток [33]. Все эти способы позволили уменьшить размывание полосы неудерживаемого компонента, однако размывание полос удерживаемых компонентов было больше расчетного. Среди последних работ в области капиллярной ЖХ большая часть посвящена исследованию колонок с каналами очень малого диаметра [34 - 38].

Основное уравнение для жидкостной хроматографии в открытой капиллярной колонке выведено Голеем [23]:

$$H = \frac{2D_M}{u} + \frac{(11k'^2 + 6k' + 1)d_c^2}{96(1 + k')^2 D_M} u + \frac{2k'd_f^2}{3(1 + k')^2 D_s} u \quad (3)$$

$$= \frac{2D_M}{u} + (C_M + C_s)u \quad (4)$$

где H - высота, эквивалентная теоретической тарелке, u - линейная скорость подвижной фазы, k' - коэффициент емкости, d_c - диаметр колонки, d_f - толщина слоя неподвижной фазы, D_M и D_s - коэффициенты диффузии молекул исследуемого вещества в подвижной и неподвижной фазах соответственно. Первый член правой части уравнений (3) и (4) описывает вклад продольной молекулярной диффузии, а второй и третий члены - вклады сопротивления массопереносу соответственно в подвижной и неподвижной фазах. Коэффициент диффузии вещества в жидкости во много раз меньше, чем в газе, поэтому второй член (C_M) в ЖХ намного больше, чем в ГХ.

В работе Нокса и Гильберта [39] выведено уравнение для ЖХ в открытой капиллярной колонке с использованием приведенных величин:

$$h = \frac{2}{\nu} + \frac{11k'^2 + 6k' + 1}{96(1 + k')^2} \nu + \frac{2k'}{3(1 + k')^2} \left(\frac{d_f}{d_c}\right)^2 \left(\frac{D_M}{D_s}\right) \quad (5)$$

где h - приведенная высота, эквивалентная теоретической тарелке ($h = H/d_c$), а ν - приведенная линейная скорость ($\nu = u d_c / D_M$).

Для достижения высокой эффективности открытой капиллярной колонки очень важно уменьшить вклад второго члена (C_M) в высоту, эквивалентную теоретической тарелке. На рис. 3-12 показана зависимость члена C_M от k' и диаметра колонки. Чтобы сопротивление массопереносу в подвижной фазе

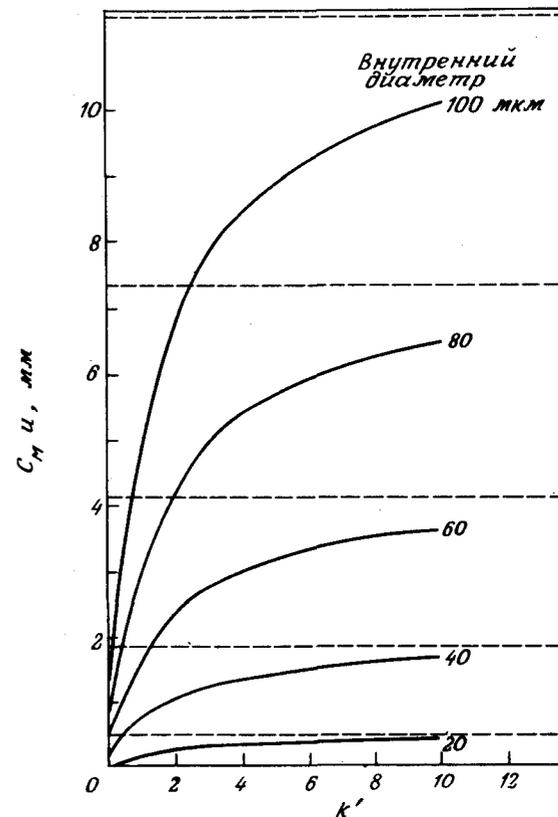


Рис. 3-12. Зависимость $C_M u$ от k' и диаметра колонки. $u = 1$ см/с; $D_M = 1 \cdot 10^{-5}$ см²/с. Штриховые линии соответствуют предельным значениям C_M при $k' \rightarrow \infty$.

уменьшилось, открытые капиллярные колонки должны работать в условиях, обеспечивающих более интенсивную диффузию, например при более высоких температурах или с менее вязкими подвижными фазами.

Бристоу и Нокс [40] предложили новый параметр E - сопротивление разделению, пользуясь которым можно сравнивать характеристики колонок различных типов, работающих в неодинаковых условиях (см. разд. 1.3.).

$$E = \frac{t_0}{N} + \frac{\Delta P}{N} \times \frac{1}{\eta} \quad (6)$$

$$= h^2 \phi \quad (7)$$

где t_0 - время выхода из колонки неудерживаемого компонента, N - число теоретических тарелок, ΔP - перепад давления на колонке, η - вязкость подвижной фазы, h - приведенная высота, эквивалентная теоретической тарелке, и ϕ - сопротивление данной колонки. У открытых (безнасадочных) колонок значение ϕ меньше, чем у насадочных, как с плотной, так и со свободной набивкой. Это означает, что ЖХ на открытых колонках позволит добиться большей эффективности разделения, чем на насадочных колонках ВЭЖХ. Нокс [41] рассчитал характеристики колонок трех разных типов и сделал вывод, что при эффективности разделения более нескольких сотен тысяч тарелок открытые капиллярные колонки должны легко выдерживать конкуренцию с насадочными колонками.

3.5.2. Аппаратура

В настоящее время жидкостные хроматографы, предназначенные для разделения на открытых капиллярных колонках, серийно не выпускаются. Эти колонки имеют очень малый внутренний объем. Так, при внутреннем диаметре колонки 50 мкм и длине 5 м он составляет всего около 10 мкл. При применении таких капилляров в качестве разделительных колонок нужно серьезно считаться с внеколоночными эффектами. Для ЖХ на открытых капиллярных колонках объемная скорость в большинстве случаев не должна превышать 1 мкл/мин. Жидкостных насосов, обеспечивающих подачу подвижной фазы с такой малой скоростью, не существует. Объемы дозатора и детектора также должны быть очень малыми, иногда менее 10 нл. Таким образом, нужную аппаратуру каждому исследователю приходится создавать самостоятельно [26, 35, 36, 38].

3.5.3. Открытые капиллярные колонки с неподвижной фазой, нанесенной на стенки колонки

Открытые (безнасадочные) и насадочные капиллярные колонки широко используются в ЖХ. Применительно к ЖХ основной их недостаток заключается в том, что неподвижная жидкая фаза постепенно смывается со стенок колонки подвижной фазой. Тем не менее такие колонки все-таки получили распространение, поскольку их сравнительно легко изготовить и они удобны для изучения параметров, влияющих на эффективность разделения. Зависимость эффективности колонки от вязкости подвижной и неподвижной фаз, диаметра трубки, толщины пленки неподвижной фазы, коэффициента емкости и линейной скорости подвижной фазы можно определить из уравнения (3). Эффективность колонки зависит также и от ряда других факторов, однако предсказать их значение, пользуясь основным уравнением, не представляется возможным. В число этих факторов входит предварительная подготовка колонки, объем дозатора и объем вводимой пробы.

Стеклянные капиллярные трубки малого диаметра можно изготовить с помощью имеющихся в продаже устройств для вытягивания стеклянных капилляров. Изготовленные таким способом капилляры обрабатывают кислотой или щелочью и наносят на их внутренние стенки неподвижную фазу. Из двух известных способов нанесения неподвижной фазы - динамического и статического - для капилляров с очень узким каналом больше подходит динамический способ. Поскольку в этом случае толщина пленки неподвижной фазы зависит от скорости ее нанесения, для получения хорошей эффективности колонки важно, чтобы эта скорость была постоянной. Для этого к капилляру, на стенки которого наносится неподвижная фаза, подсоединяют "буферный" капилляр, диаметр которого должен быть равен диаметру колонки. Согласно сообщениям [42], при нанесении полярной неподвижной фазы для повышения эффективности колонки целесообразно предварительно обработать ее раствором щелочи.

На рис. 3-13 изображена хроматограмма, полученная при разделении ксилолов и *m*-крезола на капиллярной колонке внутренним диаметром 33 мкм и длиной 8,13 м, покрытой β, β' -оксидипропионитрилом. Элюент следует предварительно насытить неподвижной фазой, в противном случае эффективность колонки быстро уменьшается. Если проба растворена в растворителе более сильном, чем подвижная фаза, объем вводимой пробы должен быть минимально возможным. Если же растворитель пробы по силе равен подвижной фазе или слабее ее, объем пробы можно несколько увеличить.

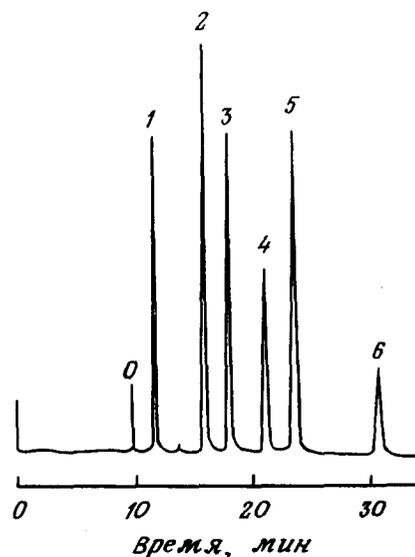


Рис. 3-13. Разделение изомеров ксилола и *m*-крезола на открытой капиллярной колонке. Колонка 33 мкм (внутр. диам.) \times 8,13 м; неподвижная жидкая фаза β, β' -оксидипропионитрил (ВОР); подвижная фаза *n*-гексан, насыщенный ВОР; объемная скорость 0,80 мкл/мин; объем пробы 0,024 мкл; детектор УФ, длина волны 280 нм.

0 - растворитель, 1 - 2,6-ксилол, 2 - 2,4-ксилол, 3 - 2,3-ксилол, 4 - 3,5-ксилол, 5 - 3,4-ксилол, 6 - *m*-крезол.

Эффективность разделения можно существенно повысить, уменьшив скорость подвижной фазы. На рис. 3-14 показана хроматограмма ароматических аминов. Разделение осуществлялось на колонке внутренним диаметром 37 мкм и длиной 20 м, покрытой β, β' -оксидипропионитрилом [43]. Эффективность этой колонки для неудерживаемого компонента составляет 740 000 теоретических тарелок за 155 мин, а для пика с $k' = 1,22$ ее эффективность оказалась равной 200 000 теоретических тарелок. При такой высокой эффективности даже компонент с $k' = 0,006$ дает пик (2), отдельный от пика растворителя ($k' = 0$).

Исходя из уравнения (6), можно предсказать, что при снижении вязкости подвижной фазы эффективность колонки должна повыситься. Вязкость низкомолекулярных алканов, например пропана или бутана, меньше чем у гексана. При прохождении неудерживаемого компонента через открытую капиллярную колонку при относительно большой линейной скорости подвижной фазы первым и третьим членом в уравнении (3) можно пренебречь и квадрат объема наблюдаемого пика можно выразить уравнением

$$V_{(obs)2} = \frac{\pi^2 d_c^6 L}{96 D_M} u \quad (8)$$

где L - длина трубки. С помощью этого уравнения легко вычислить D_M . На рис. 3-15 приведена зависимость квадрата объема наблюдаемого пика неудерживаемого компонента от линейной скорости подвижной фазы [44]. Коэффициент диффузии исследуемого вещества в различных алканах можно вычислить на основании данных, приведенных на рис. 3-15. Так, коэффициенты диффузии бензола в бутане и пропане равны соответственно около $7 \cdot 10^{-5}$ и $1 \cdot 10^{-4}$ $\text{см}^2/\text{с}$; они в 1,6, и в 2,3 раза больше соответствующей величины для *n*-гексана.

На рис. 3-16 показана хроматограмма разделения изомеров ксилола на короткой открытой капиллярной колонке с *n*-бутаном и пропаном в качестве подвижной фазы [44].

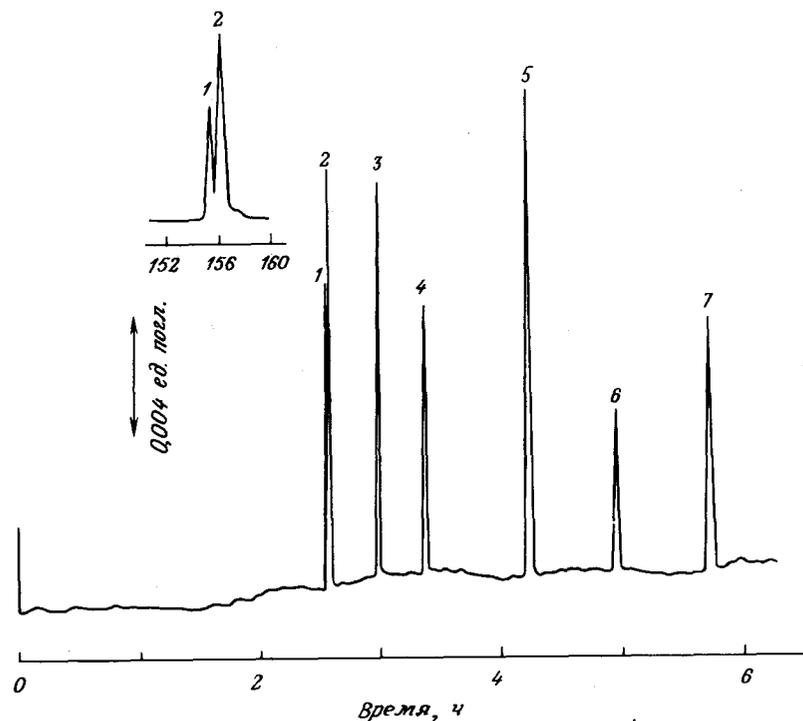


Рис. 3-14. Разделение ароматических аминов на открытой капиллярной колонке. Колонка 37 мкм (внутр. диам.) \times 20 м, неподвижная фаза β, β' -оксидипропионитрил; объемная скорость 0,14 мкл/мин; детектор УФ, длина волны 230 нм.

Пики: (k' , N): 1 - изооктан (0; 740 000); 2 - *N, N*-диэтиланилин (0,006; 610 000), 3 - *N*-фенил- α -нафтиламин (0,17; 450 000), 4 - *N*-фенил- β -нафтиламин (0,31; 360 000), 5 - анилин (0,64; 320 000), 6 - α -нафтиламин (0,92; 250 000), 7 - β -нафтиламин (1,22; 200 000).

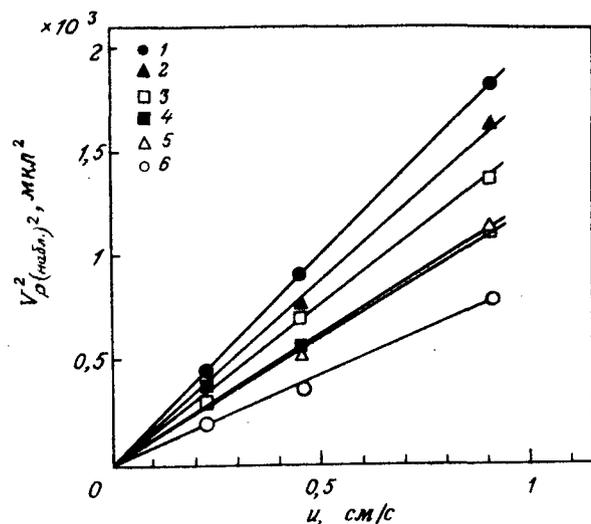


Рис. 3-15. Зависимость квадрата объема наблюдаемого пика неудерживаемого компонента от линейной скорости подвижной фазы. Колонка 0,35 мм (внутр. диам.) \times 3,8 м; проба бензол; температура 18°C; подвижная фаза: 1 - *n*-гексан, 2 - неопентан, 3 - *n*-пентан, 4 - *n*-бутан, 5 - изобутан, 6 - пропан.

Рис. 3-17 демонстрирует быстрое разделение изомеров ксилола на короткой открытой капиллярной колонке при использовании пропана в качестве подвижной фазы с линейной скоростью 11 см/с.

3.5.4. Адсорбционные колонки

В газовой хроматографии на открытых капиллярных колонках внутренние стенки колонок перед нанесением неподвижной фазы подвергают щелочной обработке или травлению. Так, авторы работы [25] обрабатывали капилляр из мягкого стекла 2,5 н. раствором гидроксида натрия в течение 2 - 8 ч при 100°C. Полученную таким образом колонку использовали для разделения сильных производных аминокислот. Оптимальные условия предварительной обработки колонок такого типа подробно изучены Исии и сотр. [45].

При обработке поверхности стекла раствором щелочи на ней образуется слой силикагеля, вследствие чего удельная поверхность стеклянного капилляра существенно увеличивается. На рис. 3-18 изображена сделанная с помощью сканирующего

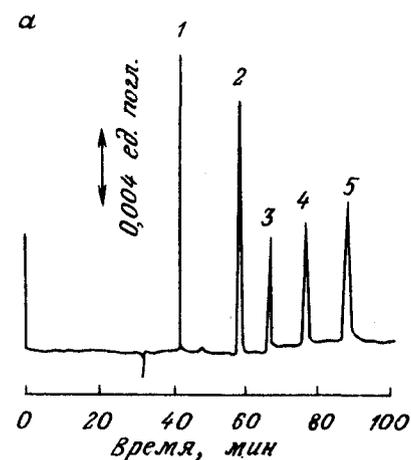
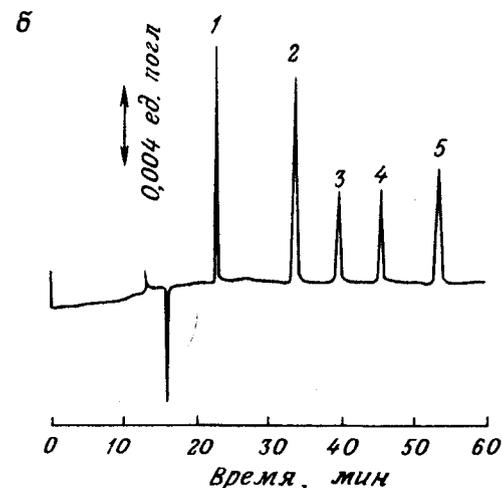


Рис. 3-16. Разделение изомеров ксилола на открытой капиллярной колонке с применением низкомолекулярных алканов в качестве подвижных фаз. Колонка 37 мкм (внутр. диам.) \times 19,2 м, неподвижная фаза β,β' -оксидипропионитрил; детектор УФ, длина волны 280 нм; подвижная фаза *n*-бутан (а) и пропан (б); объемная скорость 0,69 (а) и 1,4 мкл/мин (б).

1 - 2,6-ксилол; 2 - 2,5-ксилол, 3 - 2,3-ксилол, 4 - 3,5-ксилол, 5 - 3,4-ксилол.



электронного микроскопа фотография поверхности стекла, обработанного раствором щелочи [45]. Структура, плотность и гидродинамические свойства полученных агрегатов зависят от продолжительности и температуры обработки, а также от природы щелочи и концентрации щелочного раствора. Неподвижную фазу можно химически привить к этим агрегатам. Харак-

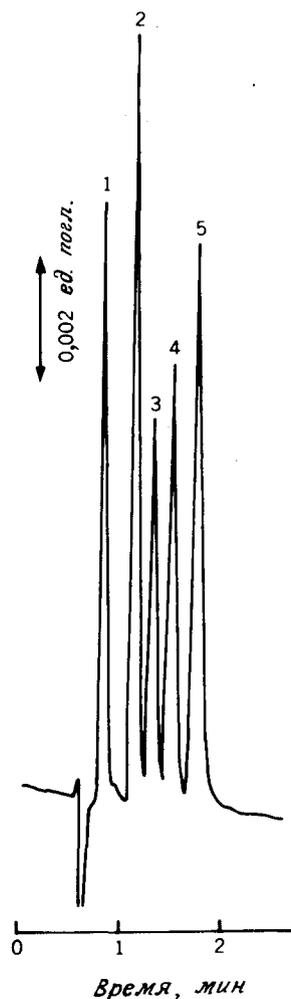


Рис. 3-17. Быстрое разделение изомеров ксилола на короткой открытой капиллярной колонке с пропаном в качестве подвижной фазы. Колонка 33 мкм (внутр. диам.) x 3,4 м; неподвижная фаза β, β -оксидипропионитрил; подвижная фаза пропан; объемная скорость 5,6 мкл/мин. Идентификация пиков и длина волны УФ-детектора см. рис. 3-16.

теристики колонок с такой привитой неподвижной фазой рассмотрены в разд. 3.5.5.

На рис. 3-19 приведена хроматограмма фенолов на адсорбционной капиллярной колонке [46]. Внутренняя поверхность этой колонки обрабатывалась в течение двух суток 1 н. раствором гидроксида натрия при температуре 54°C.

Выбор подвижных фаз для такого рода колонок значительно шире, чем для колонок, не прошедших перед нанесением неподвижной фазы предварительной обработки.

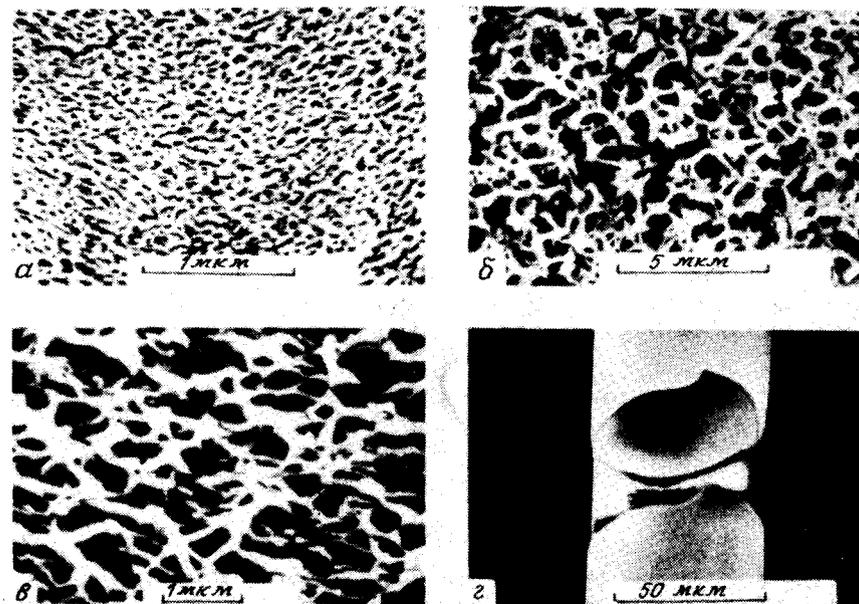


Рис. 3-18. Фотография поверхности стекла, обработанного раствором щелочи, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. Натриевое стекло обрабатывали 1 н. раствором гидроксида натрия в течение двух суток при комнатной температуре (а - в) или при 64°C (г).

Увеличение и угол: x 3500, 60° (а); x 7500, 0° (б); x 20 000, 60° (в); x 750, 30° (г).

3.5.5. Колонки с химически привитой неподвижной фазой

Получению открытых капиллярных колонок для ЖХ с химически привитыми неподвижными фазами посвящено несколько статей. В частности, описано нанесение слоя октадецилсилана на поверхности колонок из кварцевого [47], мягкого [34] и боросиликатного [38] стекла. Согласно сообщениям, характеристики приготовленных таким способом колонок оказались достаточно стабильными. Исии и Такеучи [48] опубликовали обзор, посвященный способам нанесения неэкстрагируемых неподвижных фаз на стенки открытых капиллярных колонок для ЖХ и характеристикам таких колонок. В числе прочих в обзоре рассматриваются открытые капиллярные колонки с привитым ОДС и ионообменные колонки.

Благодаря высокой стабильности открытые капиллярные колонки с привитой неподвижной фазой пригодны для работы

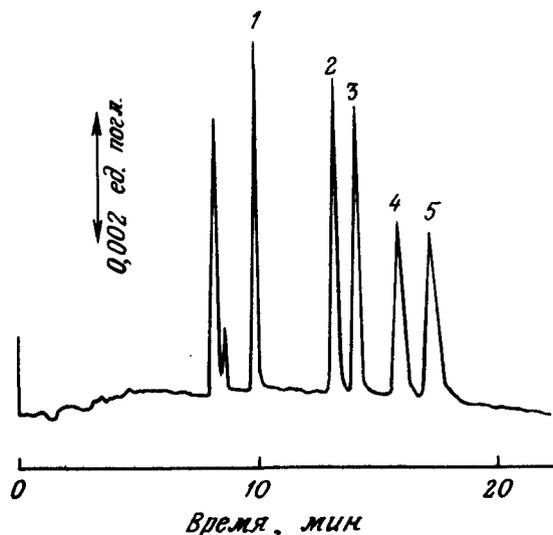


Рис. 3-19. Разделение фенолов на открытой капиллярной колонке, стенки которой покрыты слоем силикагеля. Колонка 43 мкм (внутр. диам.) x 5,8 м обработана 1 н. раствором гидроксида натрия в течение двух суток при 54°C; подвижная фаза *n*-гексан с 0,2% этилацетата и 0,8% метанола; объемная скорость 1,1 мкл/мин; детектор УФ, длина волны 280 нм.

1 - 2,6-ксилол, 2 - 2,4-ксилол, 3 - *o*-крезол, 4 - 3,5-ксилол, 5 - *m*-крезол.

в режиме градиентного элюирования, применяемом в обычной ВЭЖХ, а также в режиме программирования температуры.

На рис. 3-20 и 3-21 представлены хроматограммы многоядерных ароматических углеводородов, полученные с использованием градиентного элюирования и программирования температуры [49].

Рис. 3-22 демонстрирует разделение нуклеозидов на катионообменной колонке. Как следует из приведенных хроматограмм, колонки с ароматической и алифатической ионообменной смолой имеют различную селективность [50].

3.5.6. Колонки с сшитой полимерной фазой

Полистирольные или полисилоксановые неподвижные фазы становятся неэкстрагируемыми после проведения сшивки их молекул. В ГХ на открытых капиллярных колонках используется такая сшитая неподвижная фаза. Характеристики колонок со сшитой полистирольной и полисилоксановой неподвижными фазами описаны в работах [51] и [52]. Полисилоксановые ко-

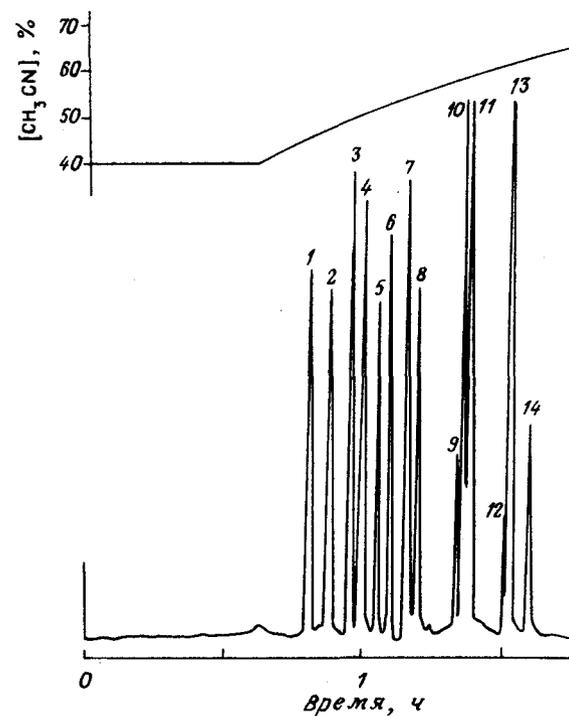


Рис. 3-20. Разделение многоядерных ароматических углеводородов на открытой капиллярной колонке с привитой неподвижной фазой в режиме градиентного элюирования. Колонка 32 мкм (внутр. диам.) x 22 м; привитая неподвижная фаза октадецил; изменение состава подвижной фазы (ацетонитрил/вода) в процессе разделения показано на рис.; объемная скорость 0,52 мкл/мин; температура колонки 36°C; детектор УФ, длина волны 250 нм.

1 - бензол, 2 - нафталин, 3 - бифенил, 4 - флуорен, 5 - фенантрен, 6 - антрацен, 7 - флуорантен, 8 - пирен, 9 - *p*-терфенил; 10 - хризен, 11 - 9-фенилантрацен, 12 - пиринен, 13 - бенз(а)-пирен, 14 - 1,3,5-трифенилбензол.

лонки в последнее время используются особенно успешно, поскольку они термостойки и не экстрагируются растворителями.

На рис. 3-23 показано разделение фталатов на колонке со сшитым полисилоксаном SE-54 в режиме градиентного элюирования [52].

3.5.7. Колонки, модифицированные динамическим способом

Пропустив через колонку с силикагелем подвижную фазу, содержащую катионный или неионогенный детергент, можно модифицировать силикагель этим детергентом *in situ* и в результате получить гидрофобную неподвижную фазу. Колонки с диоксидом кремния, динамически модифицированные ионами тетраалкиламмония с длинными алкильными цепями, работают

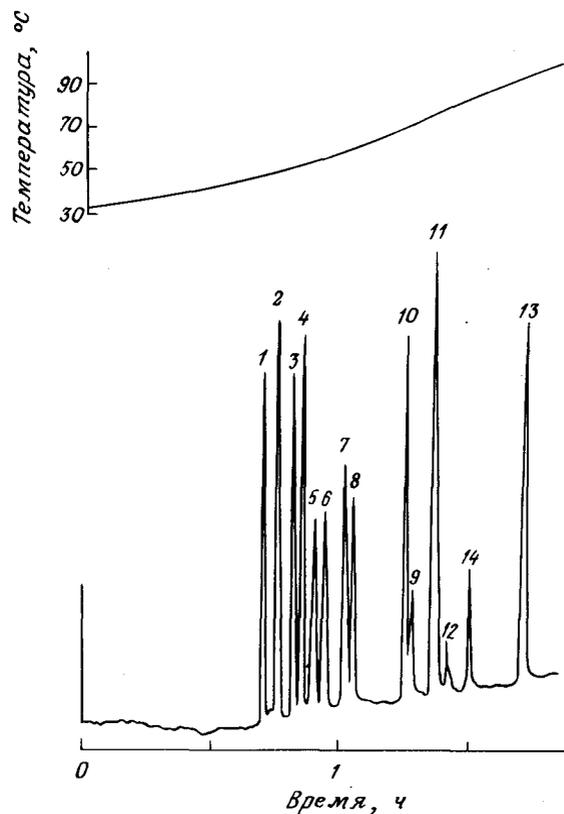


Рис. 3-21. Разделение многоядерных ароматических углеводородов на открытой капиллярной колонке с привитой неподвижной фазой в режиме программирования температуры. Колонка та же, что и на рис. 3-20; подвижная фаза ацетонитрил/вода (4/6); давление на входе 40 кг/см²; детектор УФ, длина волны 254 нм. Нумерация пиков та же, что и на рис. 3-20.

аналогично колонкам с химически привитым октадецилсиланом. Преимущество динамического модифицирования колонок состоит в том, что, меняя модификатор, удается несколько изменить селективность. Этот способ модифицирования открытых капиллярных колонок для ЖХ описан в статье [53].

Капилляры из натриевого стекла обрабатывали 1 н. раствором гидроксида натрия и затем промывали подвижной фазой с гидрофобным пленкообразующим детергентом, например бромидом алкилтриметиламмония, до тех пор, пока время удерживания выбранного стандарта не становилось постоянным. Так как адсорбированные детергенты трудно смыть с поверх-

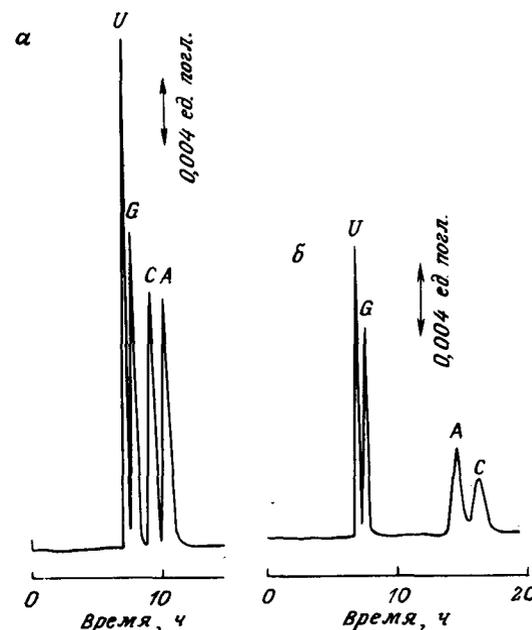


Рис. 3-22. Разделение нуклеозидов на открытых капиллярных колонках с привитыми катионообменными группами. Колонки: а - 44 мкм (внутр. диам.) x 5,2 м с -C₆H₄SO₃H; б - 52 мкм (внутр. диам.) x 5,3 м с -C₂H₄SO₃H; подвижная фаза - формиат аммония, а - 2·10⁻³ моль/л, pH 2,2; б - 1·10⁻³ моль/л, pH 3,4. Объемная скорость 1,1 (а) и 1,7 мкл/мин (б); детектор УФ, длина волны 260 нм.

Пики: U - уридин (12 нг); G - гуанозин (12 нг); C - цитидин (13 нг); A - аденозин (11 нг).

ности диоксида кремния, можно использовать в этих целях градиентное элюирование.

На рис. 3-24 приведена хроматограмма многоядерных ароматических углеводородов, полученная при их разделении на колонке с динамически модифицированным силикагелем в режиме градиентного элюирования. В качестве детергента использовался бромид цетилтриметиламмония (цетримид). Характеристики колонок с силикагелем, динамически модифицированных цетримидом, аналогичны характеристикам колонок с химически привитым октадецилсиланом.

3.6. НАСАДОЧНЫЕ КАПИЛЛЯРНЫЕ КОЛОНКИ

3.6.1. Введение

Насадочные капиллярные колонки широко применяются в ГХ. Основная их характеристика - отношение диаметра колонки к диаметру частиц насадки. Проницаемость таких колонок выше, чем у плотноупакованных колонок, и ниже, чем у капиллярных.

Цуда и Новотны [54] первыми применили в ЖХ насадочные капиллярные колонки, диаметр которых был меньше обычного примерно в 10 раз.

Вследствие хорошей проницаемости насадочных капиллярных колонок они могут быть достаточно длинными, что позволяет достигать большой эффективности разделения. Согласно сообщениям, получить длинные насадочные капиллярные колонки проще, чем плотноупакованные колонки. Для этого насадку вначале вводят в обычную стеклянную трубку с широким каналом, которую затем вытягивают в капилляр.

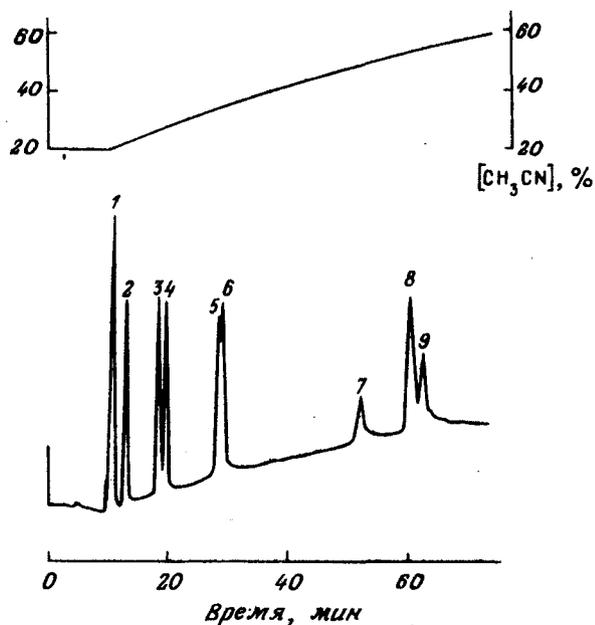


Рис. 3-23. Разделение фталатов на открытой капиллярной колонке со стенками, покрытыми сшитой неподвижной фазой, в режиме градиентного элюирования. Колонка 38 мм (внутр.диам.) x 5,3 м; неподвижная фаза сшитый силикон SE-54; подвижная фаза ацетонитрил вода (изменение состава фазы в процессе разделения показано на рисунке); объемная скорость 0,69 мкл/мин; детектор УФ, длина волны 235 нм.

Пики: 1 - диметилфталат; 2 - диэтилфталат; 3 - диизопропилфталат; 4 - ди-*n*-пропилфталат; 5 - диизобутилфталат; 6 - ди-*n*-бутилфталат; 7 - дигептилфталат; 8 - ди-2-этилгексилфталат; 9 - динонилфталат.

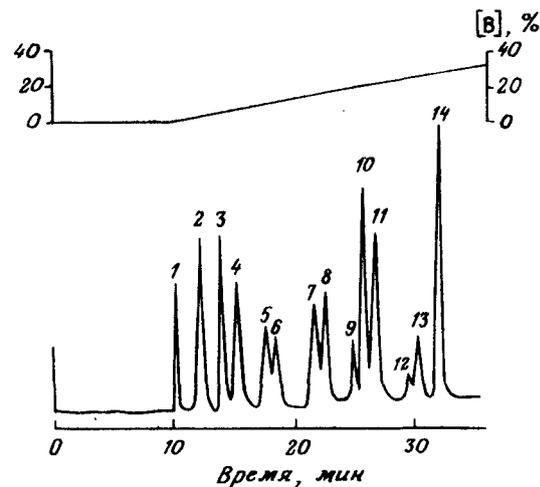


Рис. 3-24. Разделение многоядерных ароматических углеводородов на открытой капиллярной колонке, модифицированной динамическим методом, в режиме градиентного элюирования. Колонка 35 мкм (внутр. диам.) x 7,8 м, модифицирование проводили при 45°C; подвижная фаза ацетонитрил/метанол/раствор (60 ммоль/л) фосфата (20/10/70) + 0,06% (масса/объем) цетримиды, pH 7,37 (а); ацетонитрил/метанол (75/25) + 0,06% (масса/объем) цетримиды (б); изменение состава подвижной фазы в процессе разделения показано на рисунке; объемная скорость 1,04 мкл/мин; температура колонки 31°C; детектор УФ, длина волны 254 нм. Нумерация пиков, как на рис. 3-20.

3.6.2. Изготовление насадочных капиллярных колонок

Оксид алюминия или силикагель тщательно высушивают, насыпают в трубку из мягкого стекла (внутренний диаметр 0,25-0,6 мм и наружный диаметр около 6 мм) и уплотняют насадку вибрацией. Далее эту трубку на специальной установке вытягивают в капилляр, диаметр которого можно регулировать путем изменения скорости вытяжки и/или диаметра исходной стеклянной трубки. Более предпочтительны трубки из мягкого, а не из боросиликатного стекла, поскольку первое размягчается при менее высокой температуре, а с повышением температуры увеличивается вероятность повреждения насадки. В работе [55] описано изготовление колонок с различными химически привитыми неподвижными фазами *in situ* путем пропускания силанизирующих реагентов через капилляр.

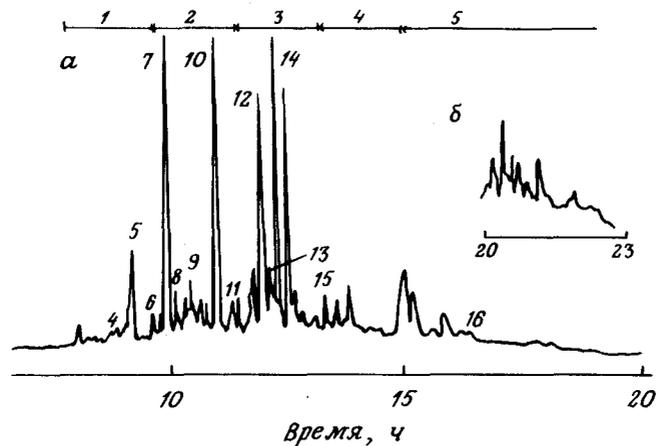


Рис. 3-25. Хроматограмма разделения ароматической фракции каменноугольной смолы на насадочной капиллярной колонке в режиме ступенчатого градиентного элюирования. Колонка 70 мкм (внутр.диам.) x 55 м; неподвижная фаза основной оксид алюминия (30 мкм), модифицированный ОДС.

Пики: 1 - бензол, 2 - нафталин, 3 - бифенил, 4 - флуорен, 5 - фенантрен, 6 - антрацен, 7 - флуорантен, 8 - пирен, 9 - трифенилен, 10 - бенз(а)антрацен, 11 - хризен, 12 - бенз(е)пирен, 13 - перилен, 14 - бенз(а)-пирен, 15 - дибензо(г,н,и)перилен, 16 - коронен.

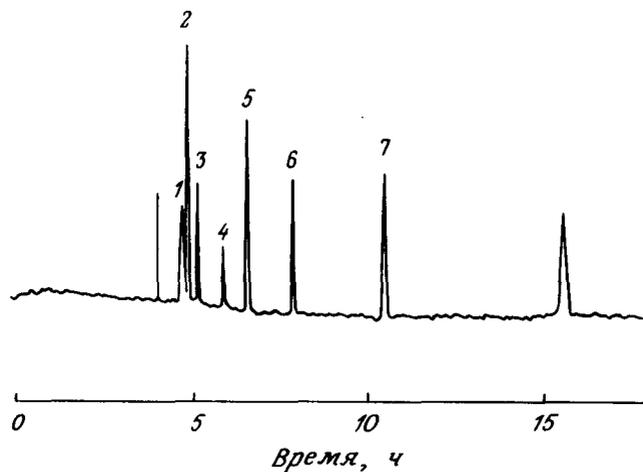


Рис. 3-26. Разделение фталатов на насадочной капиллярной колонке. Колонка 47 мкм (внутр.диам.) x 10,3 м; насадка диоксид кремния; давление на входе 500 кг/см²; линейная скорость 4,4 см/с.

Пики: 1 - дидецил-, 2 - динонил- и диоктил-, 3 - дигептил-, 4 - дидецил-, 5 - дибутил-, 6 - дипропил-, 7 - диэтил-, 8 - диметилфталат.

3.6.3. Аппаратура

Работа с насадочными капиллярными колонками в ЖХ связана с рядом технических трудностей, аналогичных тем, с которыми сталкивается исследователь при работе с безнасадочными капиллярными колонками. Для достижения очень малых объемных скоростей подачи элюента (1 мкл/мин и меньше) применяют деление потока [54]. Осуществляется также ступенчатое градиентное элюирование [56]. Пробы либо непосредственно вводятся в колонку [56], либо применяется метод деления пробы [54]. Для детектирования используются модифицированные УФ-спектрометры [54-56] и флуоресцентные спектрометры [56], а также электрохимические детекторы [57].

3.6.4. Характеристики насадочных капиллярных колонок

Эффективность колонки определяется отношением ее диаметра к диаметру частиц насадки. Для насадки с частицами диаметром 30 мкм оптимальное отношение равно 2 - 3, а для насадки с частицами размером 10 мкм несколько выше: 4 - 6. Если это отношение превышает 10, то становится возможным перемещение частиц в колонке в направлении потока элюента.

На рис. 3-25 изображена хроматограмма ароматических соединений, содержащихся в каменноугольной смоле, полученная методом ступенчатого градиентного элюирования на колонке 70 мкм (внутр. диам.) x 55 м, заполненной основным оксидом алюминия, к поверхности которого привит ОДС [55].

На рис. 3-26 показано разделение фталатов на колонке 47 мкм (внутр. диам.) x 10,3 м, заполненной силикагелем [58]. Эффективность этой колонки, рассчитанная по последним двум пикам, составляет соответственно 68 000 и 53 000 теоретических тарелок.

3.7. ПОЛУМИКРОКОЛОНКИ

3.7.1. Введение

Хроматографическое разделение на микроколонках рассматривается во многих публикациях. Чтобы отличать микроколонки от колонок обычного размера, авторы используют несколько разных терминов. По Бейзи и Оливеру [59], чаще всего в литературе применяются термины, перечисленные в табл. 3-1. Однако по этим терминам очень трудно судить о внутреннем диаметре колонок, поскольку они лишь указывают

Таблица 3-1. Термины, используемые для описания различных полумикроколонок

Наименование колонки	Внутренний диаметр, мм
Микроколонок	0,05 - 2,8
Колонка с узким каналом	0,25 - 1,0
Колонка с малым отверстием	0,05 - 2,0
Колонка малого диаметра	2,0

на то, что размеры этих колонок меньше обычных. Поэтому, пользуясь этими названиями, следует также указывать размеры колонок. Более того, как уже указывалось в гл. 2, классификация колонок по одному только внутреннему диаметру недостаточна, колонки следует классифицировать по их объемам. Выше мы решили называть колонки, объем которых составляет около 1/10 объема обычных колонок (внутренний диаметр 4,6 мм и длина 250 мм), а объем пика неудерживаемого компонента равен примерно 10 мкл, *полумикроколонтками*.

Полумикроколонтки необходимо отличать от настоящих *микроколонок*, объем которых составляет менее 1/100 объема обычных колонок. В соответствии с таким определением, к типичным полумикроколонткам относятся колонки следующих размеров:

Внутренний диаметр, мм	Длина, мм
1,0	500
1,5	250
2,1	100

В настоящее время получили распространение колонки внутренним диаметром 4,6 мм и длиной 25 - 30 мм. Они также относятся к полумикроколонткам. Смысл этой классификации состоит в том, что для всех полумикроколонок объем неудерживаемого пика равен примерно 10 мкл. При одном и том же объеме пика могут применяться любые системы ВЭЖХ, дающие одинаковое инструментальное размытие полосы (суммарный объем внеколоночного пика). При этом размытие пика не зависит от размеров колонки.

3.7.2. Аппаратура

Если разделение ведется на полумикроколонтке, наиболее важную роль играет то обстоятельство, что в этом случае обычная аппаратура для ВЭЖХ нуждается в очень небольших изменениях. Практически они сводятся лишь к замене дозатора и детектора на аналогичные узлы с меньшими размерами.

Достаточно, например, установить в прибор миниатюрный кран-дозатор с вводимым объемом 1 - 3 мкл и детектор с проточной микрокюветой объемом 1 - 2,5 мкл. Что касается насоса, то большинство обычных насосов для ВЭЖХ обеспечивают подачу элюента со скоростями, приемлемыми для полумикроколонок (100 - 300 мкл/мин). Таким образом, замена обычной на полумикроколонтку не требует никаких специальных приспособлений, необходимых при работе с микроколонтками, объем которых составляет менее 1/100 объема обычных колонок.

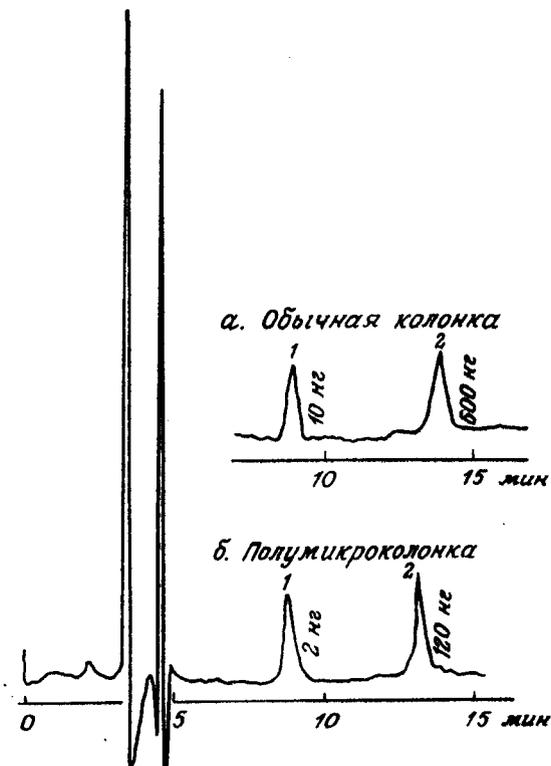


Рис. 3-27. Сравнительная чувствительность анализа на полумикроколонтке и на обычной колонке для ВЭЖХ. Подвижная фаза ацетонитрил/вода (75/25); детектор УФ, длина волны 250 нм, 0,005 ед.погл. на всю шкалу.

а: Обычная ВЭЖХ. Колонка 4,6 мм (внутр.диам.) x 250 мм; неподвижная фаза Fine Sil C₁₈; объемная скорость 1,0 мл/мин; кювета детектора: внутр. диам. 1 мм, длина пробега луча 10 мм. б: Полумикро-ВЭЖХ. Колонка 1,5 мм (внутр.диам.) x 250 мм; неподвижная фаза Fine Sil C₁₈; объемная скорость 100 мл/мин; кювета детектора: внутр. диам. 0,5 мм, длина пробега луча 5 мм. Пики: 1 - нафталин, 2 - антрацен.

3.7.3. Чувствительность

Как было показано в гл. 2, для проб одинаковой массы при одинаковых условиях хроматографирования концентрация компонента в максимуме пика, элюированного из полумикроколоники, в 10 раз выше, чем в пике, элюированном из обычной колонки [60]. На рис. 3-27 сравнивается чувствительность анализа при разделении по методу ВЭЖХ на полумикроколонику и обычной колонке. Поскольку в приборе с полумикроколонику используется УФ-детектор с кюветой в 5 мм, а в хроматографе с обычной колонкой - такой же детектор с кюветой в 10 мм, то, как показывает прямое сопоставление, чувствительность полумикросистемы выше в 5 раз.

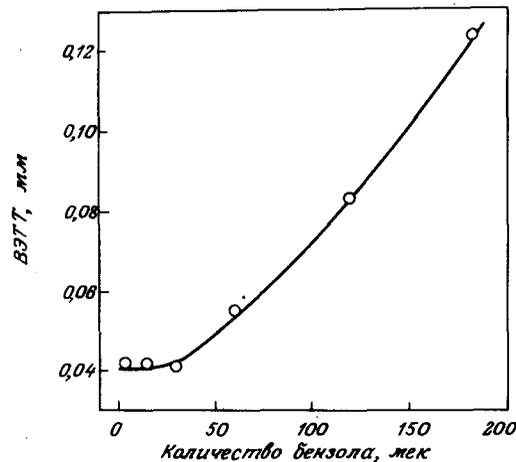


Рис. 3-28. Емкость колонки для полумикро-ВЭЖХ. Колонка 1,5 мм (внутр.диам.) x 250 мм; неподвижная фаза Fine Sil C₁₈; элюент ацетонитрил/вода (50/50); объемная скорость 100 мкл/мин; хроматографируемый компонент бензол ($k' = 4,5$).

3.7.4. Объем пробы

Размер пробы, которую можно ввести в колонку, не снижая эффективность разделения, зависит от объема колонки. Поскольку последний пропорционален квадрату внутреннего диаметра колонки, допустимый объем вводимой пробы быстро падает с уменьшением этого диаметра. На рис. 3-28 показана зависимость между массой введенной пробы и эффективностью колонки. В полумикроколонику 1,5 мм (внутр. диам.) x 250 мм), заполненную силикагелем с привитым ОДС, вводили бензол ($k' = 4,5$). Как следует из указанной зависимости, при

вводе до 40 - 50 мкг заметного уменьшения эффективности не наблюдалось. Если хроматографическая система оснащена УФ-детектором, то масса пробы составляет от 1 нг до 1 мкг; если же применяется флуоресцентный детектор, то она лежит в пределах от 1 пг до 1 нг, следовательно, максимальный размер пробы в 40 - 50 мкг вполне достаточен почти во всех случаях. Для обычной колонки максимальный размер пробы составляет около 1 мг.

3.7.5. Расход растворителя

Поскольку объем полумикроколоники равен примерно 1/10 объема обычной колонки, объемная скорость элюента, необходимая для достижения одинаковой с обычной колонкой линейной скорости, также составляет около 1/10 объемной скорости, применяемой в обычной колонке. Благодаря этому при одних и тех же условиях и одной и той же ожидаемой продолжительности анализа расход растворителя при разделении на полумикроколонику составляет всего около 10% объема растворителя, необходимого для разделения на обычной колонке. Применительно к рутинному анализу это означает существенную экономию ресурсов лаборатории. Если же применяемый в качестве подвижной фазы растворитель очень дорог или опасен для людей и окружающей среды, то снижение его потребления имеет еще более важное значение. Экономически немаловажно также и то обстоятельство, что количество насадки, необходимое для заполнения полумикроколоники, не превышает 10% того количества насадки, которое расходуется при заполнении обычных колонок.

3.7.6. Высокоскоростной анализ

В последнее время предпринимаются попытки сократить продолжительность анализа, не снижая эффективности разделения [8-12]. Один из способов ускорения анализа состоит в уменьшении длины колонки. Однако, поскольку число теоретических тарелок пропорционально длине колонки, то простое уменьшение ее длины приведет к ухудшению разделения. Чтобы этого не случилось, обычно укороченные колонки заполняют насадкой с более мелкими частицами. Сократить продолжительность анализа можно также, увеличивая линейную (и соответственно объемную) скорость подвижной фазы. Однако при этом возрастает давление на входе и расход растворителя, между тем максимальное входное давление ограничено техническими параметрами применяемого прибора. На рис. 3-29 по-

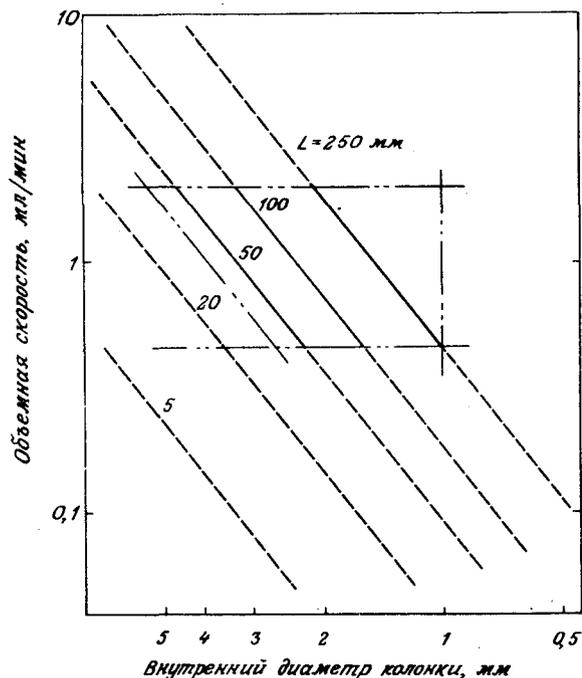


Рис. 3-29. Взаимосвязь между объемной скоростью и внутренним диаметром колонки в высокоскоростной ВЭЖХ. Сплошные линии соответствуют уменьшению продолжительности анализа на 90%.

казана взаимосвязь между объемной скоростью подвижной фазы и внутренним диаметром колонки. Область, ограниченная сплошными линиями, соответствует уменьшению продолжительности анализа в 10 раз. Если разделение ведется на колонке 4,6 мм (внутр. диам.) x 50 мм, объемная скорость составляет 2 мл/мин, то продолжительность анализа на обычном приборе для ВЭЖХ можно сократить на 90%. В полумикро-ВЭЖХ аналогичного результата можно достигнуть, используя колонку 2,1 мм (внутр. диам.) x 100 мм при объемной скорости подвижной фазы 800 мкл/мин. Для 4,6 мм (внутр. диам.) x 50 мм объем наблюдаемого пика составляет 20% объема пика, получаемого на обычной колонке, а для колонки 2,1 (внутр. диам.) x 100 мм - всего 10% объема пика обычной колонки. Следовательно, для обеих колонок необходим детектор с объемом кюветы не более 1 - 2 мкл.

3.7.7. Изготовление полумикроколонок

Готовые колонки для полумикро-ВЭЖХ в настоящее время выпускаются многими фирмами [61]. Однако ассортимент их по сравнению с ассортиментом колонок для обычной ВЭЖХ более скуден, поэтому исследователю часто приходится изготавливать полумикроколонтки самому, пользуясь обычными материалами.

3.7.7а. Материалы на базе кремнезема. Полумикроколонтки заполняют суспензионным методом точно так же, как и обычные колонки. Насадочный материал диспергируют в растворителе и получают суспензию. Эту суспензию заливают в сосуд, к которому присоединена пустая колонка. После этого в сосуд под давлением подают растворитель, вытесняя суспензию в колонку. Чтобы пользоваться этой методикой, можно было получить высокоэффективную колонку, необходимо соблюдать три условия:

1. Суспензия насадочного материала в растворителе должна быть как можно более однородной.
2. В процессе набивки колонки суспензия должна находиться в стабильном состоянии.
3. В процессе набивки в сосуде должно поддерживаться достаточно высокое давление.

Таблица 3-2. Суспензии, применяемые для набивки колонок

Растворитель	Концентрация, об. %
Метанол	10,0
Изопропанол	5,0
Циклогексанол	10,0
Циклогексан	4,0
1,1,1-Трихлорэтан	70,0
Нонипол-40	1,0

Чтобы суспензия была достаточно однородной, необходим растворитель, имеющий высокое сродство к насадочному материалу. Целесообразно использовать также поверхностно-активные присадки. При неудачной подготовке растворителя для суспензии насадочный материал начнет слипаться и образовывать комки. В табл. 3-2 указаны составы растворителей, использованные Кувата и сотр. [62] для получения суспензий кремнезема с привитым ОДС (лихросорб RP-18) и кремнезема с привитыми аминогруппами (нуклеосил 5NH₂). Для улучшения однородности суспензии в раствор добавляли метанол и

поверхностно-активное вещество нониполь 40 (нонилфениловый эфир полиэтиленгликоля^{*}).

Вследствие различия в плотности насадочного материала и растворителя первый может постепенно осаждаться. Для поддержания стабильности суспензии обычно применяются "суспензии со сбалансированной плотностью" [63] или "высоковязкие суспензии" [64], что позволяет предотвратить осаждение насадочного материала во время набивки колонки.

В первом случае выбирается такой растворитель, плотность которого равна плотности материала насадки. Благодаря этому осаждение последнего из суспензии не происходит. Чтобы уравнивать плотности материала насадки и растворителя, в качестве растворителей используются галогенсодержащими соединениями, отличающимися высокой плотностью (см. табл. 3-3). Однако эти растворители токсичны и требуют осторожного обращения, поэтому данный прием в настоящее время не имеет столь широкого, как раньше, распространения.

Таблица 3-3. Растворители, рекомендуемые для регулировки плотности при суспензионном заполнении колонок

Растворитель	Плотность, г/мл
Диодметан	3,0
1,1,2,2-Тетрабромэтан	3,0
Дибромметан	2,5
Иодметан	2,3

При заполнении колонок высоковязкими суспензиями скорость осаждения насадочного материала в процессе заполнения уменьшается путем повышения вязкости суспензии. С этой целью в суспензию вводят изопропанол или циклогексанол (см. табл. 3-2). Применяются и другие растворители, в том числе *n*-гексанол, полиэтиленгликоль 200, этиленгликоль и глицерин. Важно, чтобы каждый участок насадки в колонке подвергался одинаковому давлению и чтобы вся насадка была однородной. Были испытаны следующие методы:

1. Растворитель подается при контролируемой объемной скорости таким образом, чтобы обеспечить постоянное давление в течение всего процесса заполнения.

2. Давление в процессе заполнения постепенно повышается [62]. Если заполнение колонки проводится при постоянном давлении, объемная скорость в начале и в конце операции су-

щественно различается. Указанный прием позволяет также уменьшить изменение объемной скорости в процессе заполнения колонки.

3. Применение ограничителя; препятствующего резкому падению давления сразу по окончании набивки колонки [65]. Этот вариант метода также позволяет уменьшить изменение объемной скорости.

Насос, применяемый для набивки полумикроколонок, должен обеспечивать подачу растворителя с объемной скоростью порядка нескольких миллиметров в минуту при давлении до 500 кг/см². Для этой цели пригодно большинство коммерческих насосов для ВЭЖХ. Если для набивки колонки используется циркуляционный насос, работающий при постоянном расходе, а не пневматический насос постоянного давления, то достигаемое давление сильно зависит от сопротивления системы потоку. Последнее изменяется во времени в процессе набивки, поскольку максимальная объемная скорость для насосов этого типа обычно не превышает 10 мл/мин. В результате реальное давление часто не может достигнуть заданной величины из-за слишком малого сопротивления потоку до тех пор, пока в колонку не будет введено достаточное количество насадочного материала. После этого сопротивление колонки становится достаточно большим, давление в насосе достигает заданной величины и скорость потока регулируется автоматически.

Благодаря вязкостному сопротивлению потоку слой насадки в колонке формируется под определенным давлением. Давление, приложенное к тому или иному участку насадки в колонке, непосредственно не связано с рабочим давлением насоса или видимым перепадом давления на колонке, а зависит от объемной скорости. Поэтому, если в процессе набивки объемная скорость уменьшается (что, естественно, происходит при постоянном давлении на выходе насоса), насадка в головной части колонки получится более рыхлой, чем в нижней ее части. Это наводит на мысль, что заполнение при постоянной объемной скорости должно быть более эффективным и должно обеспечивать более равномерную набивку колонки по всей ее длине и тем самым более высокую эффективность колонки. Характеристики колонки в большой мере зависят от давления, которому подвергается ее насадка в процессе набивки. При работе с насадкой на основе кремнезема необходимо давление не менее 500 кг/см², что близко к максимальному для коммерческих насосов для ВЭЖХ. При меньших давлениях эффективность полученной колонки непременно будет меньше.

3.7.7б. Материалы на полимерной основе. Суспензионный метод пригоден и для набивки колонок пористыми полимерными гелями. При этом обязательно следует соблюдать два условия:

* Sanyo Kasei Kogyo Co., Ltd., 11 Nomoto-cho, Hitotsubashi, Higashiyama-ku, Kyoto, Japan.

1. Пористый полимерный гель набухает в растворителе, однако степень его набухания изменяется в зависимости от природы или состава применяемого растворителя. Поэтому для приготовления суспензии и набивки колонки следует применять такие растворители, в которых гель набухает меньше, чем в подвижной фазе, с которой предполагается работать в дальнейшем. В противном случае во время анализа возможна усадка геля, в результате чего в колонке образуются пустоты и колонка быстро выходит из строя.

2. Прочность геля из пористого полимера меньше, чем прочность насадок на основе кремнезема. Она зависит от типа материала и колеблется в интервале от нескольких десятков килограммов на квадратный сантиметр до 200 кг/см². При заполнении колонки давление должно составлять порядка 90% предела прочности насадки. Если использованное при набивке давление недостаточно, то пики из такой колонки элюируются с "хвостами". Если же давление чересчур велико, то, напротив, у пиков образуются "языки".

3.7.7в. Сосуд для суспензии. Объем сосуда для суспензии должен превышать объем набиваемой колонки примерно в 10 раз. Если сосуд слишком велик, то процесс набивки займет слишком много времени и набивка будет неудовлетворительной из-за осаждения насадочного материала. Следует также проверить соответствие фитингов колонки и сосуда и в случае необходимости снабдить сосуд для суспензии другим фитингом, позволяющим присоединить к нему пустую колонку, предназначенную для набивки.

В табл. 3-4 приведены характеристики рекомендуемых принадлежностей, а в табл. 3-5 - рекомендуемые насадочных материалы и методики заполнения полумикроколонок.

Таблица 3-4. Скорость подачи подвижной фазы:
10 - 990 мкл/мин (1,0 - 9,9 мл/мин)

Система	Спецификация
Насос ^а	Объемная скорость: 10-990 мкл/мин (1,0-9,9 мл/мин) Максимальное давление: 500 кг/см ² Режим: при постоянной скорости подачи или при постоянном давлении
Резервуар для суспензии	Объем: 4 мл

^а FAMILIC-300S (JASCO) или аналогичный.

Таблица 3-5. Рекомендуемые методики суспензионной набивки полумикроколонок для ВЭЖХ

Насадка	Диаметр частиц, мкм	Растворитель Суспензия	Растворитель для набивки и методика ^а
Fine Sil C ₁₈ -10	10	n-гексанол-хлороформ (1:1)	Хлороформ (4 мл/мин ПП → 500 кг/см ² ПД), 15 мин
Fine Sil C ₈ -10 Fine Sil C ₁ -10	10	То же	Хлороформ (4 мл/мин ПП → 500 кг/см ² ПД), 10 мин → метанол (500 кг/см ² ПД), 5 мин → метанол/вода (500 кг/см ² ПД), 5 мин → метанол (500 кг/см ² ПД), 5 мин
Fine Sil	5	n-Гексанол - дихлорметан (1:1)	Дихлорметан (2 мл/мин ПП → 500 кг/см ² ПД), 15 мин
Fine GEL 110 (полистирольный гель ^б)	10	Метанол	Метанол (0,5 мл/мин, ПП), 15 мин; максимальное давление 200 кг/см ²
Fine GEL 101 (полистирольный гель ^в)	8	Тетрагидрофуран	Тетрагидрофуран (0,1 мл/мин ПП → 0,15 мл/мин ПП), 3 ч; максимальное давление 80 кг/см ²

Внутр. диам. колонки 1,5 мм, длина 250 мм
^а ПП - постоянная объемная скорость; ПД - постоянное давление.
^б Для обращенно-фазовой хроматографии.
^в Для эксклюзионной хроматографии (внутр. диам. колонки 2,1 мм).

3.7.8. Насадочные материалы

Для заполнения полумикроколонок пригодны практически любые насадочные материалы. При надлежащем качестве заполнения характеристики полученной полумикроколонки не отличаются от характеристик обычной колонки с такой же насадкой. Поэтому все насадки, разработанные для обычной ВЭЖХ, пригодны без каких-либо изменений и для полумикро-ВЭЖХ.

В качестве справочного материала в приложении приведен перечень насадок, опубликованный Маджорсом [66]. Из них только насадки на полимерной основе применяются в полумикро-ВЭЖХ относительно редко. Однако это не означает, что они менее пригодны для полумикро-ВЭЖХ. Просто до последнего времени в этой области ЖХ более популярны были такие распространенные насадочные материалы, как силикагель или силикагель, модифицированный ОДС. Пористые полимеры, ионообменные смолы и насадки для эксклюзионной хроматографии также являются хорошими материалами для заполнения полумикроколонок. В работе Хиби и сотр. [67], например, описано разделение методом эксклюзионной хроматографии на полумикроколонках с полимерной насадкой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yang F.J. J. Chromatogr., 1982, 236, 265.
2. Takeuchi T., Ishii D. J. Chromatogr., 1984, 288, 451.
3. Takeuchi T., Ishii D. J. Chromatogr., 1982, 253, 41.
4. Van der Wal S.J., Yang F. J. High Resolut. Chromatogr./Chromatogr. Commun., 1983, 6, 216.
5. Ishii D., Hibi K., Asai K., Nagaya M. J. Chromatogr., 1978, 152, 341.
6. Takeuchi T., Ishii D., Nakanishi A. J. Chromatogr., 1984, 285, 97.
7. Takeuchi T., Ishii D. J. Chromatogr., 1981, 213, 25.
8. Scott R.P.W., Kucera P., Munroe M. J. Chromatogr., 1979, 186, 475.
9. DiCesare J.L., Dong M.W., Ettre L.S. Chromatographia, 1981, 14, 257.
10. DiCesare J.L., Dong M.W., Attwood J.G. J. Chromatogr., 1981, 217, 369.
11. DiCesare J.L., Dong M.W., Ettre L.S. In "Introduction to High-Speed Liquid Chromatography"; Perkin Elmer, Norwalk, CT, 1981, p. 1.
12. Erni F. J. Chromatogr., 1983, 282, 371.
13. Ishii D., Takeuchi T. J. Chromatogr., 1983, 255, 349.
14. Hirose A., Wiesler D., Novotny M. Chromatographia, 1984, 18, 239.
15. Takeuchi T., Watanabe Y., Ishii D. High Resolut. Chromatogr./Chromatogr. Commun., 1980, 4, 300.
16. Hirata Y., Jinno K. High Resolut. Chromatogr./Chromatogr. Commun., 1983, 6, 196.
17. Takeuchi T., Watanabe Y., Matsuoka K., Ishii D. Chromatogr., 1981, 216, 196.
18. Takeuchi T., Ishii D., Saito M., Hibi K. J. Chromatogr., 1984, 295, 323.
19. Jinno K. High Resolut. Chromatogr./Chromatogr. Commun., 1982, 5, 364.
20. Fujimoto C., Jinno K. High Resolut. Chromatogr./Chromatogr. Commun., 1983, 6, 374.

21. Golay M.J.E. Anal. Chem., 1957, 29, 928.
22. Golay M.J.E. Anal. Chem., 1957, 180, 435.
23. Golay M.J.E. In "Gas Chromatography 1958"; Desty D.H., Ed., Butterworths: London, 1958, p. 36.
24. Horvath C.G., Preiss B.A., Lipsky S.R. Anal. Chem., 1967, 39, 1422.
25. Nota G., Marino G., Buonocore V., Ballio A. J. Chromatogr., 1970, 46, 103.
26. Hibi K., Ishii D., Fujishima I., Takeuchi T. J. High Resolut. Chromatogr./Chromatogr. Commun., 1978, 1, 21.
27. Taylor G. Proc. R. Soc. London, 1953, 219A, 186.
28. Hofmann K., Halasz I. J. Chromatogr., 1979, 173, 211.
29. Snyder L.R., Dolan J.W. J. Chromatogr., 1979, 185, 43.
30. Dolan J.W., Snyder L.R. J. Chromatogr., 1979, 185, 57.
31. Tijssen T. Sep. Sci. Technol., 1978, 13, 681.
32. Hofmann K., Halasz I. J. Chromatogr., 1980, 109, 3.
33. Tsuda T., Nomura K., Nakagawa G. J. Chromatogr., 1982, 248, 241.
34. Ishii G., Takeuchi T. J. Chromatogr. Sci., 1980, 18, 462.
35. Tijssen R., Bleumer J.P.A., Smit A.L.C., Van Kreveld M.E. J. Chromatogr., 1981, 218, 137.
36. Krejci M., Tesarik K., Rusek M., Pajurek M. J. Chromatogr., 1981, 218, 167.
37. Tsuda T., Tsuboi K., Nakagawa G. J. Chromatogr., 1981, 214, 283.
38. Jorgenson J.W., Guthrie E.J. J. Chromatogr., 1983, 255, 335.
39. Knox J.H., Gilbert M.T. J. Chromatogr., 1979, 186, 405.
40. Bristow P.A., Knox J.H. Chromatographia, 1977, 10, 279.
41. Knox J.H. J. Chromatogr. Sci., 1980, 18, 453.
42. Hibi K., Tsuda T., Takeuchi T., Nakanishi T., Ishii D. J. Chromatogr., 1979, 175, 105.
43. Ishii D., Takeuchi T. In "Advances in Chromatography"; Giddings J.S., Grushka E., Cazes J., Brown P.R. Eds.; Marcel Dekker, New York, 1983; Vol. 21, p. 131.
44. Takeuchi T., Ishii D. J. Chromatogr., 1982, 240, 51.
45. Ishii D., Tsuda T., Takeuchi T. J. Chromatogr., 1979, 185, 73.
46. Ishii D., Takeuchi T. In "Reviews in Analytical Chemistry"; West T.S., Ed.; Freund Publishing House: Aberdeen, Scotland, 1982; Vol. 1V, No. 2, p. 87.
47. Yang F.J. J. High Resolut. Chromatogr./Chromatogr. Commun., 1980, 3, 589.
48. Ishii D., Takeuchi T. J. Chromatogr. Sci., 1984, 22, 400.
49. Takeuchi T., Ishii D. J. Chromatogr., 1983, 279, 439.
50. Ishii D., Takeuchi T. J. Chromatogr., 1981, 218, 189.
51. Takeuchi T., Matsuoka K., Watanabe Y., Ishii D. J. Chromatogr., 1980, 192, 127.
52. Takeuchi T., Kitamura H., Spitzer T., Ishii D. J. High Resolut. Chromatogr./Chromatogr. Commun., 1983, 6, 666.
53. Takeuchi T., Ishii D., Nakanishi A. J. Chromatogr., 1983, 281, 73.
54. Tsuda T., Novotny M. Anal. Chem., 1978, 50, 271.
55. Hirata Y., Novotny M., Tsuda T., Ishii D. Anal. Chem., 1979, 51, 1807.
56. Hirata Y., Novotny M. J. Chromatogr., 1979, 186, 521.
57. Hirata Y., Lin P.T., Novotny M., Wightman R.W. J. Chromatogr., 1980, 181, 287.
58. Tsuda T., Tanaka J., Nakagawa G. Anal. Chem., 1984, 56, 1249.
59. Basey A., Oliver R.W.A. J. Chromatogr., 1982, 251, 265-268.
60. Saito M., Wada A., Hibi K., Takahashi M. Industrial Research/Development, 1983, 25, 102-106.
61. International Chromatography Guide, J. Chromatogr. Sci., 1986, 24, 1G.
62. Kuwata K., Uebori M., Yamazaki Y. J. Chromatogr., 1981, 211, 378-382.
63. Kirkland J.J. J. Chromatogr. Sci., 1971, 9, 206.

64. Endele R., Halasz I., Unger K. J. Chromatogr., 1974, 99, 377.
65. Halasz I., Maldener G. Anal. Chem., 1983, 55, 1842-1847.
66. Majors R.E. J. Chromatogr. Sci., 1980, 18, 488-511.
67. Hibi K., Wada A., Saito M., Arita M. Pittsburgh Conference of Analytical Chemists, Atlantic City, NJ, March, 1984; Abstr. 553.

4. ДЕТЕКТИРУЮЩИЕ СИСТЕМЫ

*М. Сайто, К. Хиби, М. Гото**

4.1. ВВЕДЕНИЕ

Одной из важных проблем ВЭЖХ является выбор подходящей детектирующей системы, поскольку физические свойства подвижной фазы и компонентов анализируемой пробы весьма близки. Снайдер и Киркленд [1] классифицируют существующие подходы к проблеме детектирования следующим образом:

- 1) дифференциальное измерение какого-либо физического свойства пробы и растворителя;
- 2) измерения такого свойства пробы, которым не обладает подвижная фаза;
- 3) детектирование после удаления подвижной фазы.

Детектирующая система первого типа универсальна.

Чаще всего детектирование осуществляют, измеряя коэффициент преломления. На ранних стадиях развития ВЭЖХ рефрактометрические детекторы часто использовались в сочетании с УФ-детекторами, однако в настоящее время значение первых как детекторов универсального назначения уменьшилось, и к ним прибегают преимущественно в анализе полимеров, т. е. в эксклюзионной хроматографии. Рефрактометрический детектор почти не нашел применения в полумикро-ВЭЖХ. Отчасти это обусловлено трудностями, связанными с изготовлением измерительной ячейки малого объема и теплообменника, необходимого для обеспечения стабильной нулевой линии детектора, отчасти появлением других детектирующих систем, более удобных, чем регистрирующий рефрактометр.

Второй тип детектирующей системы, широко распространенный в настоящее время, включает детекторы по поглощению света в УФ-диапазоне спектра с фиксированной длиной волны, изменяемой длиной волны или с многоканальной регистрацией, а также флуоресцентные детекторы, детекторы по светорассеянию и электрохимические детекторы. Детектирующие системы, предусматривающие перевод разделенных компонентов пробы после выхода их из колонки в необходимые

* M. Saito, K. Hibi, Japan Spectroscopic Company, Ltd., Hachioji City, Tokyo 192, Japan. M. Goto, Research Center for Resource and Energy Conservation, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya 464, Japan.

производные (дери́ватизация), также можно отнести ко второму типу. Они обычно состоят из реакционной системы и устройства для детектирования продуктов реакции (см. гл. 6).

Система третьего типа была предложена для сочетания ЖХ с ПИД (пламенно-ионизационным детектором), МС (масс-спектрометром) и ИКС (ИК-спектрометром). Две последние системы подробно рассмотрены в гл. 5 в разделах, посвященных сочетанию ЖХ с другими аналитическими методами (см. разд. 5.1 и 5.2).

Благодаря вышеописанным преимуществам микро-ВЭЖХ, в частности высоким концентрациям выходящих из колонки компонентов и малой объемной скорости, свойства пробы и растворителя существенно разнятся, что облегчает детектирование определяемых компонентов любым из известных методов. Ниже рассмотрены принципы работы спектрального УФ-, флуоресцентного и вольтамперометрического детекторов в сочетании с микро- и полумикроколонками.

4.2. ДЕТЕКТОРЫ ПО ПОГЛОЩЕНИЮ СВЕТА В УФ-ДИАПАЗОНЕ

Наибольшее распространение в ВЭЖХ получил УФ-детектор. По отношению ко многим химическим соединениям он проявляет высокую чувствительность, отличается удовлетворительной стабильностью, достаточно широким линейным динамическим диапазоном и пригоден для решения самых различных аналитических задач. УФ-детектор был первой детектирующей системой, примененной в микро-ВЭЖХ. В работе Исии и сотр. [2] описана модификация серийного УФ-детектора с изменяемой длиной волны, пригодная для работы с системой микро-ВЭЖХ с объемом колонки в 100 раз меньше обычной. Скотт и Кучера [3] также описали модификацию проточной ячейки серийного УФ-детектора с фиксированной длиной волны, пригодную для работы с миниатюрной колонкой объемом в 10 раз меньше стандартного. В настоящее время УФ-детекторы, предназначенные для работы с колонками малого объема, выпускаются серийно [4, 5].

Коммерческие УФ-детекторы можно подразделить на три вида:

- 1) с фиксированной длиной волны;
- 2) с изменяемой длиной волны;
- 3) с многоканальной регистрацией.

Детекторы первого типа просты по конструкции и недороги, их легко приспособить для работы в системе микро-ВЭЖХ. Источниками излучения в них служат ртутные лампы низкого давления. Эти детекторы чрезвычайно чувствительны (уровень

шума $2 \cdot 10^{-5}$ ед. погл.) благодаря очень интенсивному излучению ртутной лампы при длине волны 254 нм.

Детекторы второго типа имеют умеренную стоимость, их также легко приспособить для работы в системе микро-ВЭЖХ. В последнее время они стали более популярными благодаря их большей универсальности и возможности детектирования при длине волны, соответствующей максимуму поглощения определяемого соединения. В детекторах этого типа роль источников излучения выполняют дейтериевые и вольфрамовые лампы. Излучение дейтериевой лампы соответствует диапазону от 190 до 350 нм (при применении светофильтра, отсекающего УФ-излучение, до 600 нм), а излучение вольфрамовой лампы - диапазону 350 - 700 нм. Уровень шума такого детектора обычно составляет около $5 \cdot 10^{-5}$ ед. погл. (примерно в 2,5 раза выше, чем у детектора с фиксированной длиной волны). Однако на практике детектор с изменяемой длиной волны нередко оказывается более чувствительным, если детектирование ведется при длине волны, соответствующей максимуму поглощения определяемого соединения.

Детектор последнего типа наиболее сложен по конструкции. Он работает в сочетании с системой обработки данных, позволяющей строить трехмерные хроматограммы, контурные графики и относительные хроматограммы. Однако приспособить проточную кювету такого детектора для работы с малой колонкой обычно трудно из-за сложности оптической системы.

4.2.1. Проточные кюветы

Требования к УФ-детекторам, применяемым в микро-ВЭЖХ, подробно рассмотрены в гл. 2. Некоторые вопросы работы микроколонок для ВЭЖХ в сочетании с серийными УФ-детекторами рассмотрены ниже. При выборе подходящего УФ-детектора для микро-ВЭЖХ следует прежде всего убедиться в том, что он снабжен проточной кюветой кассетного типа, позволяющей менять объем кюветы в зависимости от объема элюируемого пика.

В табл. 4-1 указаны объемы проточных кювет, необходимые для работы с разными микроколонками. Проточные кюветы объемом менее 0,3 мкл серийно не выпускаются, и если таковые необходимы, исследователь должен изготавливать их сам. На рис. 4-1 и 4-2 в качестве примеров показаны такие кюветы, изготовленные Такеучи и сотр. [6] и Янгом [7] для ВЭЖХ-систем с микроколонками объемом менее 1/100 объема обычных колонок. Эти кюветы устанавливались в окне обычной кюветы, которая в данном случае играла роль выходной щели монохроматора.

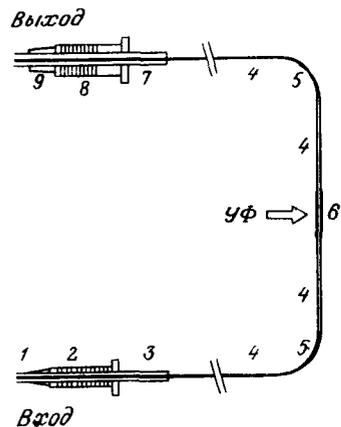


Рис. 4-1. Схема проточной микрокюветы Такеучи и сотр. [6] (с разрешения авторов). Кювета выдерживает давление 200 кг/см^2 и может использоваться не только в микро-ВЭЖХ, но и в сверхкритической флюидной хроматографии.

1 - муфта, 1/32 дюйма (0,8 мм); 2 - уплотнительный винт, 1/32 дюйма (0,8 мм); 3 - трубка из нержавеющей стали, внутренний диаметр (ВД) 0,25 мм, наружный диаметр (НД) 0,8 мм; 4 - трубка из кварцевого стекла, ВД 55 мкм, НД 0,24 мм; 5 - трубка из нержавеющей стали, ВД 0,33 мм, НД 0,63 мм; 6 - трубка из кварцевого стекла, ВД 0,26 мм, НД 0,37 мм; 7 - трубка из нержавеющей стали, ВД 0,3 мм, НД 1/16 дюйма (1,6 мм); 8 - уплотнительный винт, 1/16 дюйма (1,6 мм); 9 - уплотнение, 1/16 дюйма (1,6 мм).

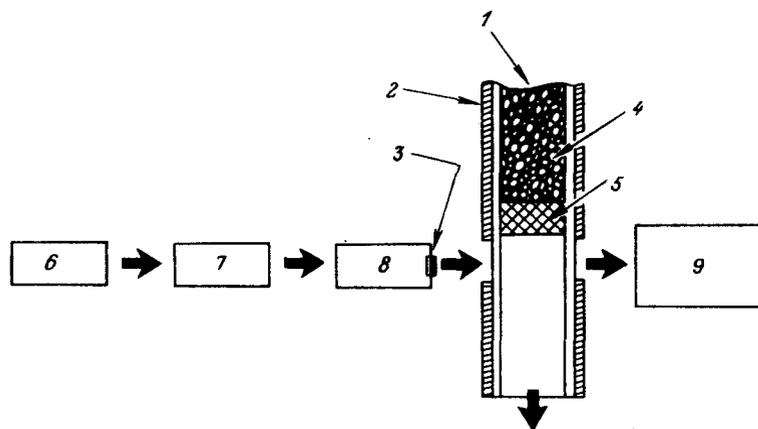


Рис. 4-2. Схема разработанной Янгом системы для непосредственного детектирования разделенных компонентов [7]. Конец колонки из кварцевого стекла с каналом малого диаметра служит проточной кюветой (с разрешения Янга).

1 - насадочная колонка из кварцевого стекла; 2 - защитный слой полимера; 3 - выходная щель монохроматора; 4 - насадка; 5 - пористый кварцевый фильтр; 6 - источник света; 7 - фокусирующий конденсор; 8 - монохроматор; 9 - фотодетектор (например, фотоумножитель).

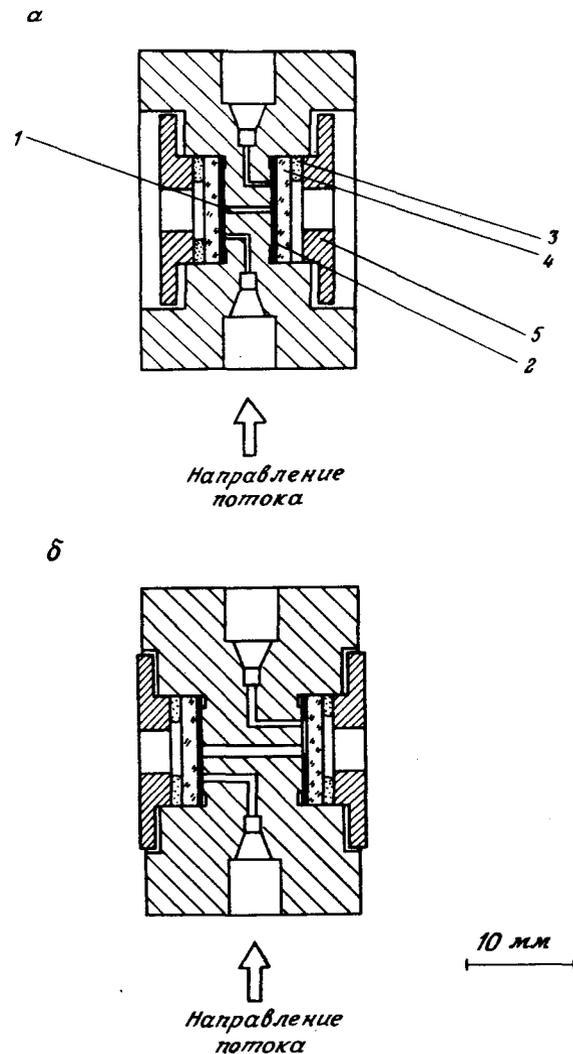


Рис. 4-3. Схема кюветы для полумикро-ВЭЖХ объемом 1 мкл с длиной пробега луча 5 мм (а) и обычной кюветы объемом 8 мкл с длиной пробега луча 10 мм (б). Обе кюветы (изображены в одном и том же масштабе) предназначены для УФ-детектора JASCO UVIDEC-100-V (с разрешения фирмы JASCO).

1 - камера кюветы 0,5 мм (внутр. диам.) x 5 мм; 2 - политетрафторэтиленовый кожух с щелью для пропускания растворителя; 3 - кварцевое окно; 4 - уплотнительное кольцо круглого сечения; 5 - уплотнительный фланец.

Таблица 4-1. Объемы кювет УФ-детекторов, применяемых в микро-ВЭЖХ.

Тип ВЭЖХ	Размеры колонки		Материал трубки	Объем кюветы, мкл
	длина, см.	внутр. диам., мм		
Капиллярная ЖХ	20	0,03	Стекло	0,03-0,05
Насадочная капиллярная ЖХ	1000 - 2000	0,03 - 0,1	Стекло	0,02
Микро-ВЭЖХ	15	0,5	ПТФЭ	0,3
Микро-ВЭЖХ	10 - 30	0,2 - 0,35	Кварцевое стекло	0,05
Полумикро-ВЭЖХ	25	1,5	Нержавеющая сталь	0,05
Обычная ВЭЖХ ^а	25	4,6	Нержавеющая сталь	8,0

^а Приводится для сравнения.

На рис. 4-3 показана конфигурация обычной кюветы объемом 8 мкл с длиной пробега луча 10 мм и микрокюветы объемом 1 мкл с длиной пробега луча 5 мм. Зависимость вариации для систем, включающих эти кюветы, от различных объемных скоростей демонстрирует рис. 4-4. Эти кюветы подключали непосредственно к крану-дозатору с петлей объемом 1 мкл [8]. Как следует из рисунка, вариации для этих двух кювет существенно различны.

На рис. 4-5 сравниваются две хроматограммы, одна из которых (а) получена с использованием кюветы объемом в 1 мкл, а другая (б) - с использованием кюветы объемом 8 мкл. Размывание пика в кювете во втором случае настолько велико, что разделение пиков 2, 3 и 4 заметно ухудшается.

В предыдущих разделах неоднократно подчеркивалось, что из системы микро-ВЭЖХ необходимо устранять малейшие мертвые объемы. Даже если детектор оснащен кюветой надлежащего объема, достаточно неаккуратного соединения или применения неподходящей трубки, чтобы сильно ухудшить характеристики всей системы. На рис. 4-6 показаны "нормальная" хроматограмма (а) и та же хроматограмма, искаженная вследствие плохого соединения дозатора, колонки и кюветы детектора (б), на которой у пиков наблюдаются большие "хвосты".

4.2.2. Чувствительность

Как уже говорилось в разд. 2-1 (см. также рис. 2-3 и табл. 2-1), одним из важнейших преимуществ микроколонок является высокая концентрация разделенных компонентов в выходящих пиках. Выходной сигнал УФ-детектора при заданной длине волны выражается в единицах поглощения согласно закону Бера:

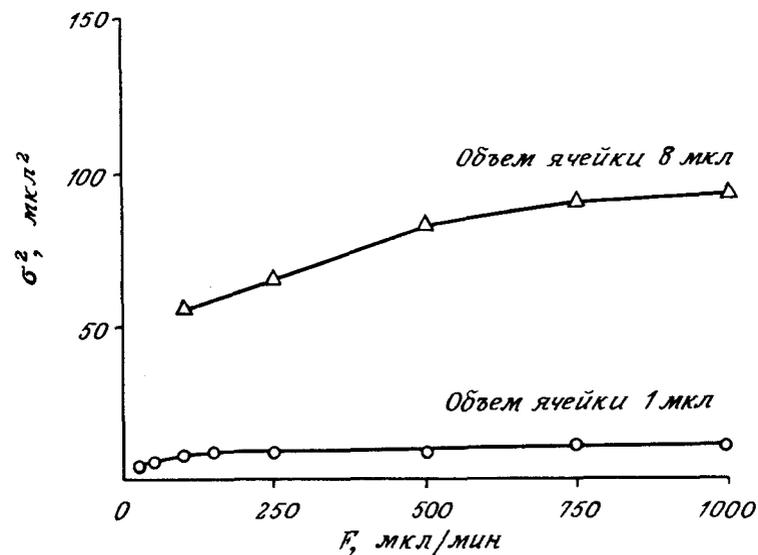


Рис. 4-4. Зависимость вариации для систем с кюветами объемом 1 и 8 мкл от объемной скорости. При проведении измерений кюветы присоединяли непосредственно к миниатюрному крану-дозатору с дозирующей петлей объемом 1 мкл. При вычислении вариаций ширину пиков (2б) измеряли на уровне 0,607 их высоты.

$$AU = \epsilon l_{dc} C_{sol} \quad (1)$$

где ϵ - молярный коэффициент поглощения данного вещества при заданной длине волны (λ); l_{dc} - длина пробега луча в кювете детектора, см; C_{sol} - концентрация определяемого вещества, моль/л. Подставляя в уравнение (1) уравнение (5) из гл. 2, получаем следующее выражение, определяющее максимум поглощения:

$$A_{p(max)} = 1600 \epsilon l_{dc} m_s / (V_p \times MM) \quad (2)$$

где MM - молекулярная масса определяемого вещества; m_s - масса пробы, г; V_p - объем пика, мл. Из этого выражения следует, что максимальная величина поглощения для данной пробы пропорциональна длине пробега луча в кювете l_{dc} и обратно пропорциональна объему пика V_p .

На рис. 4-7 приведены сравнительные данные по чувствительности для обычной ВЭЖХ и полумикро-ВЭЖХ (при применении колонки, в 10 раз меньшей по объему [9]). Хро-

Рис. 4-5. Хроматограмма *a* получена с применением кюветы объемом 1 мкл, а хроматограмма *б* - с применением кюветы объемом 8 мкл. Все остальные условия идентичны. Колонка 250 мм x 1,5 мм (внутр. диам.); неподвижная фаза Fine SIL C₁₈ (5 мкм); подвижная фаза ацетонитрил/вода (90/10); объемная скорость 100 мкл/мин; объем пробы 1 мкл; детектор УФ, 250 нм. Пики: 1 - бензол (1,0%), 2 - нафталин (0,05%), 3 - бифенил (0,01%), 4 - флуорен (0,01%), 5 - антрацен (0,001%), растворитель пробы ацетонитрил.

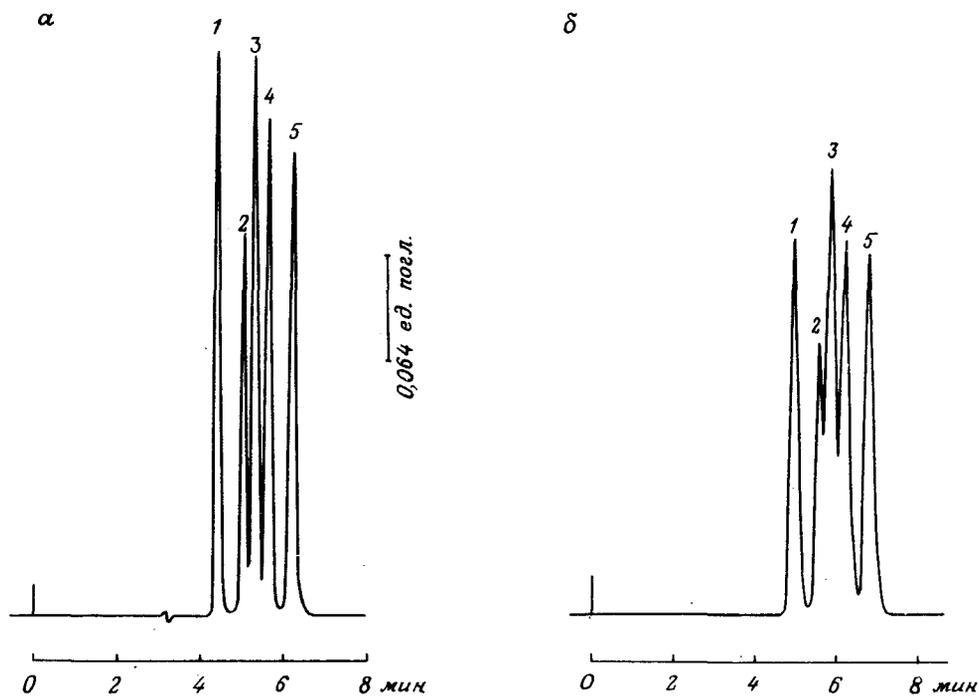
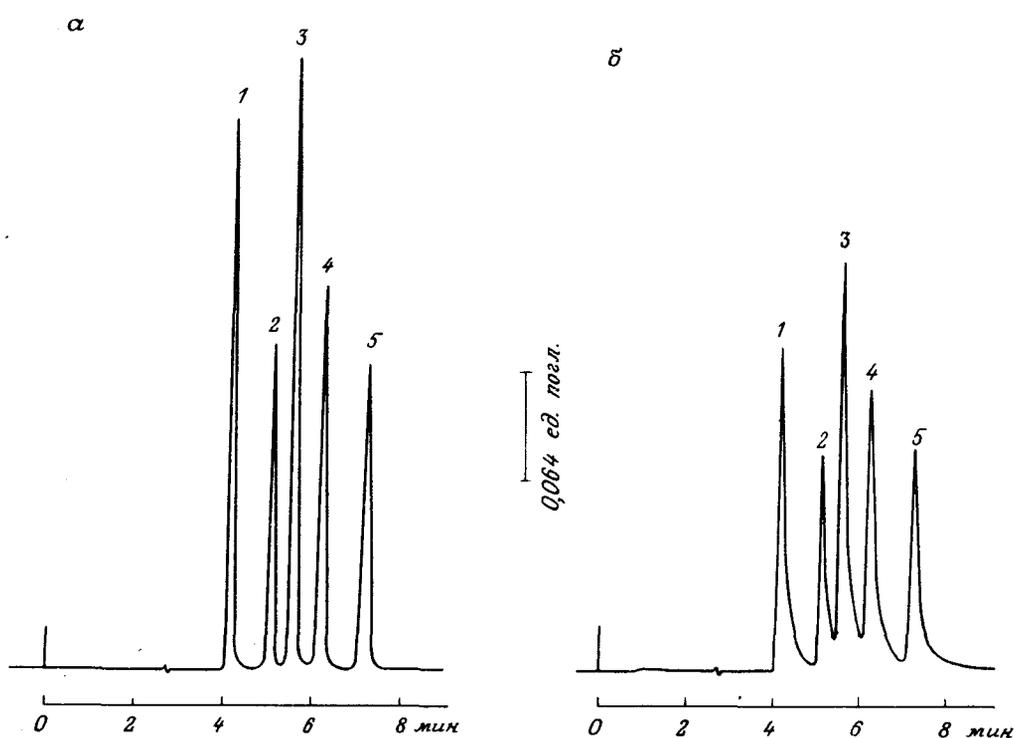


Рис. 4-6. Хроматограмма *a* получена на хроматографе с правильно присоединенной соединительной трубкой, хроматограмма *б* - на приборе с неправильно присоединенной трубкой (концы соединительных трубок не были утоплены до отказа в гнезда концевых фитингов колонки). В эксперименте использовался дозатор с дозирующей петлей объемом 1 мкл и детектор с кюветой такого же объема. Остальные условия опыта те же, что и на рис. 4-5.



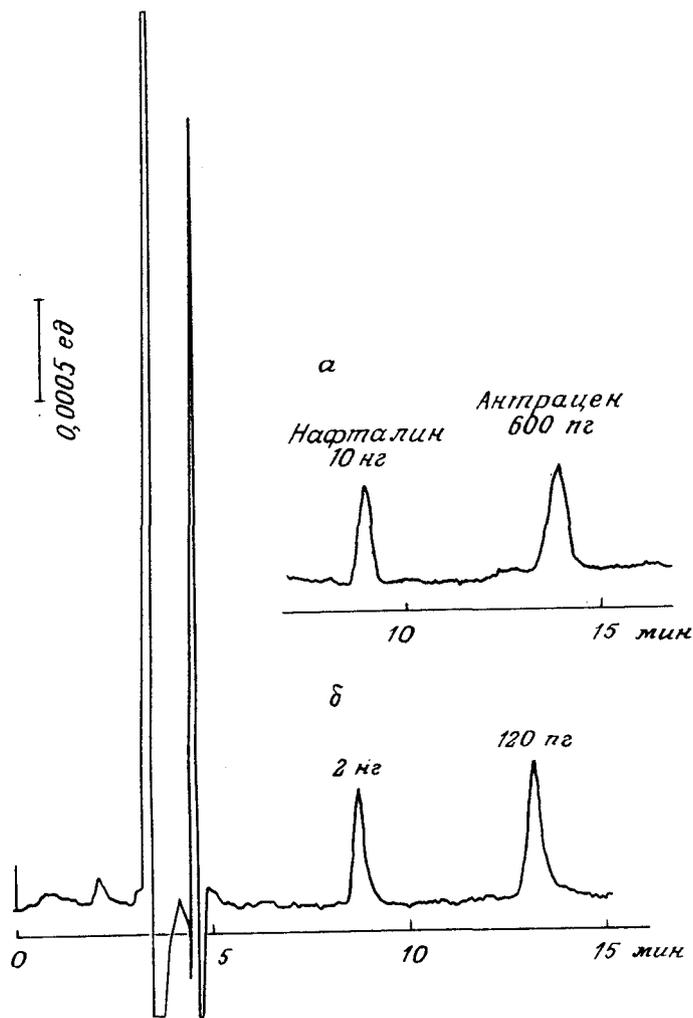


Рис. 4-7. Сравнительная чувствительность анализа, проведенного методом обычной ВЭЖХ и полумикро-ВЭЖХ. Хроматограмма *a* получена на обычной колонке (4,6 мм (внутр. диам.) x 250 мм), заполненной Fine SIL C₁₈ (10 мкм) при объеме кюветы детектора 8 мкл (длина пробега луча 10 мм). Хроматограмма *b* получена на полумикроколонке (1,5 мм (внутр. диам.) x 250 мм), заполненной тем же материалом, с тем же детектором с кюветой объемом 1 мкл (длина пробега луча 5 мм). Подвижная фаза ацетонитрил/вода (75/25), объемная скорость 1,0 мл/мин (*a*) и 100 мкл/мин (*b*).

матограмма *a* получена для системы с обычной колонкой и УФ-детектором с кюветой объемом 8 мкл (длина пробега луча 10 мм), хроматограмма *b* - для системы с полумикроколонкой и тем же детектором, но с кюветой объемом 1 мкл (длина пробега луча 5 мм). Линейные скорости подвижной фазы в обеих колонках поддерживались одинаковыми, чтобы время удерживания было одним и тем же. Поскольку объем пика, элюирующегося из полумикроколонки, в 10 раз меньше объема соответствующего пика, элюирующегося из обычной колонки, максимум поглощения пика в полумикро-ВЭЖХ при одинаковой длине пробега луча должен быть в 10 раз больше. В рассматриваемом случае, однако, длина пробега луча в системе с полумикроколонкой (объем кюветы детектора 1 мкл) вдвое меньше, чем в системе с обычной колонкой (объем кюветы 8 мкл). Следовательно, при разделении на полумикроколонке пятая часть пробы, используемой при разделении на обычной колонке, дает такое же поглощение, как и вся проба во втором случае (см. рис. 4-7). Оптическая апертура обеих

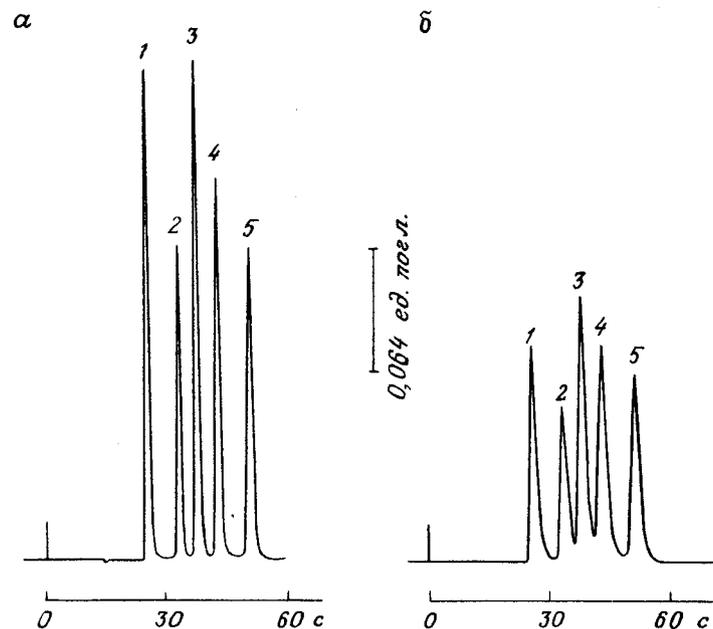


Рис. 4-8. Влияние постоянной времени детектора на форму пика. Постоянная времени для хроматограммы *a* равна 0,05 с, для хроматограммы *b* - 1,0 с. Колонка 50 мм x 4,6 (внутр. диам.), неподвижная фаза Fine SIL C₁₈ (3 мкм); подвижная фаза ацетонитрил/вода (85/15); объемная скорость 2 мл/мин; объем пробы 3 мкл; анализируемая смесь та же, что и на рис. 4-5.

кювет одинакова, уровень шума их очень близок, следовательно, чувствительность в полумикро-ВЭЖХ в пять раз выше.

4.2.3. Постоянная времени

В разд. 2-2 уже говорилось о том, что в высокоскоростном анализе постоянная времени детектора является одним из важных факторов. На рис. 4-8 изображены две хроматограммы, полученные в одинаковых условиях, но с различной постоянной времени регистрирующей системы. Для хроматограммы *a* эта постоянная равна 0,05 с, поэтому форма пиков вполне приемлема, хотя всего за 60 с из колонки элюируется пять пиков. Однако о хроматограмме *b*, полученной при постоянной времени 1,0 с, этого сказать нельзя. Из-за большой постоянной времени пики на этой хроматограмме существенно искажены, что делает ее непригодной для количественного анализа. В обоих случаях анализ проводили на колонке размером 4,6 мм (внутр. диам.) x 50 мм, заполненной силикагелем, модифицированным ОДС (размер частиц 3 мкм), при объемной скорости 2,0 мл/мин.

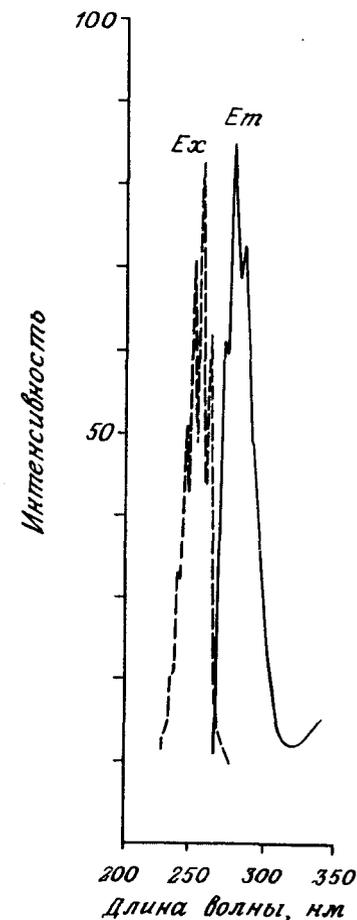
4.3. ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ДЕТЕКТОРЫ

Флуоресцентные детекторы чрезвычайно чувствительны. Они используются для селективного детектирования веществ, способных флуоресцировать при возбуждении УФ-излучением. Чувствительность такова, что позволяет обнаруживать пикограммы (*a* в отдельных случаях даже фемтограммы) определенных веществ. Для флуоресцентного детектирования характерны высокая чувствительность и селективность.

В детекторах, основанных на поглощении излучения, измеряемый сигнал представляет собой небольшое изменение на интенсивном фоне. При флуоресцентном детектировании, наоборот, сигнал, хотя и слабый, измеряется на темном фоне. Это позволяет применять в системе регистрации сигнала устройства с большим коэффициентом усиления, например фотоумножители. Основными источниками шума во флуоресцентном детекторе являются темновой ток фотоумножителя, шум предварительного усилителя, фоновая флуоресценция растворителя и паразитное излучение, связанное с рассеянием возбуждающего излучения на измерительной кювете.

Флуоресцирующие соединения возбуждаются в результате поглощения УФ-излучения при определенной длине волны и затем испускают люминесцентное излучение с большей длиной волны (см. рис. 4-9). Чтобы получить спектр возбуждения, из-

Рис. 4-9. Спектр возбуждения (*Ex*) и спектр испускания (*Em*) бензола. Проба - раствор бензола в метаноле (100.10⁻⁴%); спектрофлуориметр JASCO FP-550A. Длина волны возбуждающего излучения 220 - 300 нм, флуоресцентного излучения 280 нм; ширина щели возбуждающего монохроматора 3 нм, измерительного монохроматора 10 нм. Условия регистрации спектра испускания: длина волны возбуждающего излучения 250 нм, флуоресцентного излучения 250 - 300 нм, ширина щели возбуждающего монохроматора 5 нм, измерительного монохроматора 5 нм.



меряют интенсивность флуоресценции (обычно на максимальной длине волны испускания), одновременно изменяя длину волны возбуждающего излучения. Спектр возбуждения представляет собой зависимость интенсивности флуоресценции от длины волны возбуждающего излучения; обычно он аналогичен спектру поглощения исследуемого вещества. Спектр испускания получают путем измерения интенсивности флуоресцентного излучения при различных длинах волн. При этом длину волны возбуждающего излучения обычно устанавливают соответствующей максимуму возбуждения или поглощения. каждо-

му соединению присущи специфические спектры поглощения и испускания, которые определяются строением его молекулы. Благодаря этому исследователь может определять интересующее его соединение, устанавливая длину волны возбуждения и измерения в соответствии с максимумами спектров возбуждения и испускания. Таким образом, помехи при определении искомого вещества на выходе из колонки отсекаются как бы двумя фильтрами. Благодаря этому селективность определения существенно возрастает. Высокая селективность флуоресцентного детектора позволяет выявлять требуемые соединения в сложных многокомпонентных смесях, в том числе в биологических жидкостях, пищевых продуктах, лекарственных препаратах и окружающей среде. Кроме того, вещества, не способные к флуоресценции, можно подвергнуть пред- или послеклоночной дериватизации - обработке специальными реагентами, взаимодействующими только со специфичными группами искомого соединения и превращающими его в флуоресцирующее вещество. Такой прием позволяет существенно повысить селективность определения. Мы вернемся к этому вопросу более подробно в гл. 6. Таким образом, применение флуоресцентного детектирования тесно связано с пред- или послеклоночной дериватизацией. Авторы работы [10] описали миниатюрную послеклоночную систему для получения флуоресцирующих производных при определении аминов, а Такеучи и сотр. [11] - аналогичную систему для определения желчных кислот, в которой использовалась реакционная колонка с насадкой, содержащей иммобилизованный фермент.

4.3.1. Детектирующие системы

Детектирующие флуоресцентные системы существенно отличаются от систем, основанных на поглощении излучения. При флуоресцентном детектировании проточная ячейка облучается ультрафиолетовым излучением, которое возбуждает молекулы анализируемой пробы. Далее эти молекулы испускают во всех направлениях флуоресцентное излучение. В принципе его можно наблюдать под любым углом, однако на практике интенсивность флуоресценции обычно измеряют в направлении, перпендикулярном направлению возбуждающего излучения. Благодаря этому последнее не мешает наблюдению флуоресценции, и в результате снижается фон и шум. Удачной конструкцией кюветы, обеспечивающей эффективное измерение флуоресценции в малом объеме жидкости, описана в работе [12]. В этой системе тонкая проточная кювета помещена в центре вогнутого зеркала. Она освещается лучом возбуждающего ультрафиолетового излучения, которое падает на зеркало с тыль-

ной стороны и проходит сквозь прозрачное отверстие в его центре. Флуоресцентное излучение собирается тем же вогнутым зеркалом [13, 14].

Поскольку источником флуоресцентного излучения являются возбужденные молекулы определяемого компонента, то его интенсивность должна быть пропорциональна числу облученных молекул и, следовательно, объему раствора, подвергнутому облучению. Однако интенсивность реально наблюдаемого флуоресцентного излучения вычислить так просто не удастся по трем причинам. Во-первых, интенсивность луча возбуждающего облучения ослабляется по экспоненциальному закону вследствие поглощения его по мере проникновения в толщу раствора. Во-вторых, испускаемое молекулами вещества флуоресцентное излучение также поглощается раствором. И наконец, выходной сигнал детектора в значительной степени зависит от эффективности измерения интенсивности флуоресценции. Поэтому интенсивность флуоресценции (или, точнее, выходной сигнал флуоресцентного детектора) всегда выражается в произвольных или относительных единицах, и, как следствие, флуоресцентный детектор (в отличие от детекторов по поглощению излучения) не позволяет провести никаких абсолютных измерений.

Детектирующие системы можно подразделить на три типа:

- 1) фильтр/фильтр,
- 2) монохроматор/фильтр,
- 3) монохроматор/монохроматор (спектрофлуориметр).

Система первого типа (фильтр/фильтр) недорога и пригодна для серийного анализа, например для определения аминокислот с послеклоночным превращением их в необходимые производные (см. гл. 6). В качестве источника возбуждающего излучения широкое распространение получили ртутные лампы. Излучение этих ламп содержит лишь несколько дискретных линий с определенными длинами волн. Чаще всего используются длины волн 254 и 365 нм; другие линии применяются реже из-за относительно слабой энергии излучения и отсутствия подходящих оптических фильтров.

Система второго типа (монохроматор/фильтр) более селективна и универсальна, поскольку оператор может выбрать для возбуждения излучение с любой длиной волны. Для детекторов этого типа в качестве источников возбуждающего излучения применяются лампы с непрерывным спектром испускания, например ксеноновые или дейтериевые.

Система третьего типа (монохроматор/монохроматор) наиболее селективна и универсальна, поскольку длина волны как возбуждающего, так и измеряемого вторичного излучения может быть произвольно выбрана оператором. В некоторых случаях с помощью спектрофлуориметра удается детектировать

искомое соединение в группе плохо разделенных хроматографических пиков [15]. Некоторые спектрофлуориметры могут быть использованы также в системах фильтр/фильтр и многохроматор/фильтр с применением возбуждающего излучения так называемого нулевого порядка и подходящих светофильтров. Излучение нулевого порядка получается путем поворота спектральной решетки на такой угол, при котором решетка начинает работать как простое зеркало. В спектрофлуориметрических детекторах, специально предназначенных для ВЭЖХ, ширину спектральных линий устанавливают большей, чем в спектрофлуориметрах общего назначения (обычно 10-20 нм), чтобы повысить чувствительность анализа.

4.3.2. Зависимость чувствительности определения от объема проточной кюветы

Все рассуждения о максимально допустимом объеме кюветы, приведенные в гл. 2, справедливы и для флуоресцентного детектора, однако здесь дело обстоит несколько сложнее, чем для УФ-детектора. При детектировании по поглощению излучения чувствительность можно сохранять постоянной до тех пор, пока при уменьшении объема кюветы удастся сохранить неизменной длину пробега луча. При флуоресцентном же детектировании чувствительность пропорциональна объему облучаемого раствора. Следовательно, уменьшая объем ячейки, необходимо учитывать и вклад объема кюветы в расширение пика, и уменьшение чувствительности в результате уменьшения объема раствора. Найти оптимальное решение порой не так просто. Если уменьшить объем кюветы детектора пропорционально объему пика, то в той же пропорции уменьшится также и объем облучаемого раствора, что приведет к уменьшению массовой чувствительности детектора, хотя концентрация определяемого компонента в растворе и будет существенно выше, чем при использовании обычных колонок.

Поскольку одним из важнейших преимуществ флуоресцентного детектора является его высокая чувствительность, то на практике объем кюветы определяется объемом пика исследуемого вещества. В системах, оснащенных полумикроколонками, при детектировании умеренно удерживающихся пиков ($k' = 3 - 6$) кюветы объемом 3 - 6 мкл не дают сколько-нибудь заметного уширения пиков. В то же время чувствительность детектирования повышается благодаря высокой концентрации определяемого компонента в выходящем из колонки пике. Однако вследствие уменьшения облучаемого объема раствора применение меньших кювет (объемом порядка 1 мкл) ведет к потере этого выигрыша в чувствительности.

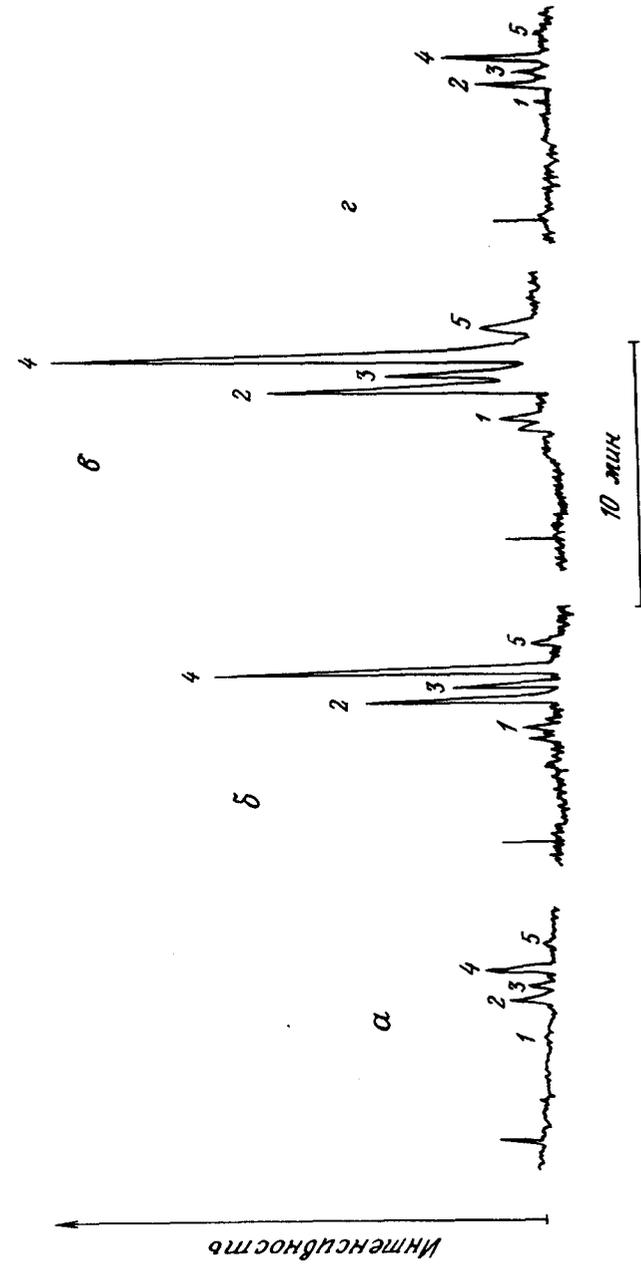


Рис. 4-10. Хроматограммы, полученные для одинаковых проб при использовании кювет с разными облучаемыми объемами. Облучаемые объемы для хроматограмм а - г равны соответственно 1,5, 3,0, 7,0 и 7,0 мкл. Хроматограммы а - в получены при разделении на полумикроколонке (1,5 мм (внутр. диам.) x 250 мм) с Fine SIL C₁₈ (10 мкм); хроматограмма г - на обычной колонке (4,6 мм (внутр. диам.) x 250 мм) с той же насадкой. Объем пробы 1 мкл; детектор спектрофлуориметрический JASCO FP-210, длина волны возбуждающего излучения 252 нм, флуоресцентного излучения 360 нм. Пики (10-4%): 1 - бензол (10), 2 - нафталин (500), 3 - бифенил (100), 4 - флуорен (100), 5 - антрацен (10); растворитель ацетонитрил.

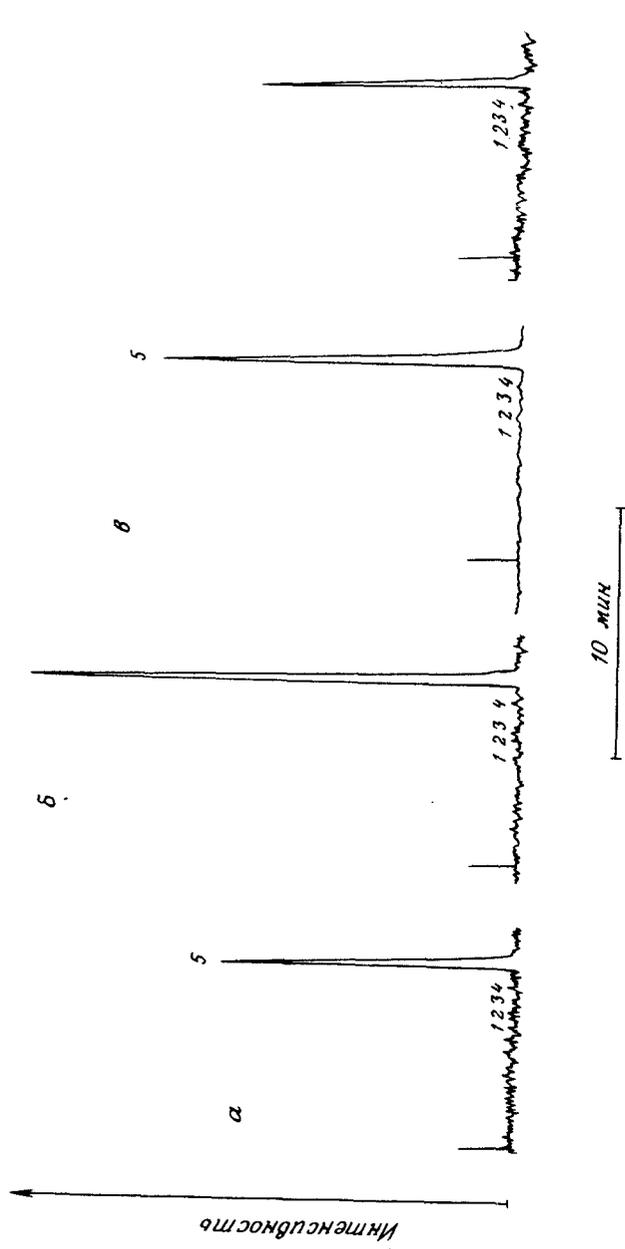


Рис. 4-11. Селективность спектрофлуориметрического детектора. Проба, колонки, кюветы детектора и объем пробы такие же, как и на рис. 4-10. Длины волн возбуждающего излучения (255 км) и измеряемого флуоресцентного излучения (395 км) являются оптимальными для определения антрацена.

На рис. 4-10 сравниваются хроматограммы, полученные с различными кюветами. Все хроматограммы соответствуют одному и тому же количеству детектируемого компонента. Хроматограммы *a* - *в* получены на одной и той же полумикроколонке, а приведенная для сравнения хроматограмма *г* - на обычной колонке. На хроматограммах *a* и *б* (кюветы объемом 1,5 и 3 мкл) пики хорошо разделены и имеют удовлетворительную форму. Что касается хроматограммы *в* (объем кюветы 7 мкл), то здесь наблюдается заметное ухудшение разделения. Хотя уровень шума в этом случае несколько повысился вследствие увеличения облучаемого объема, но высота пиков тоже возросла и отношение сигнала к шуму увеличилось пропорционально увеличению объема кюветы. На хроматограмме *г* (обычная колонка, кювета объемом 7 мкл) высоты пиков и уровень шума такие же, как на хроматограмме *a*.

Рис. 4-11 иллюстрирует высокую селективность спектрофлуориметрического детектора. На всех хроматограммах детектировались одинаковые количества вещества. Длины волн возбуждающего и измеряемого излучений были выбраны оптимальными применительно к пику *б* (антрацену). На рис. 4-10 этот пик относительно мал, а на рис. 4-11 он намного больше, отношение сигнал/шум при этом также значительно выше. В то же время все остальные пики на рис. 4-11 едва заметны.

В табл. 4-2 указаны пределы обнаружения антрацена на четырех хроматограммах, изображенных на рис. 4-11. Как следует из таблицы, минимальные детектируемые концентрации пропорциональны облучаемому объему элюата. Пределы обнаружения (минимальные детектируемые количества вещества) также пропорциональны облучаемому объему в тех случаях, когда размывание пика незначительно. В результате применение кюветы объемом 7 мкл дает не столь большое повышение чувствительности, как можно было бы ожидать исходя из соотношения объемов. Предел обнаружения при применении обычной колонки и кюветы объемом 7 мкл превышает предел обнаружения для полумикроколонки с кюветой объемом 1,5 мкл, хотя первая кювета повышает чувствительность по концентрации в 4 раза. При использовании кюветы в 7 мкл в сочетании с полумикроколонкой удается детектировать до 0,14 пг антрацена; при замене же полумикроколонки в той же системе на обычную колонку чувствительность ухудшается в 5 раз. Разумеется, необходимо отметить, что если детектируемый пик выходит очень быстро (т. е. если k' мало), то применение кюветы объемом 7 мкл влечет за собой заметное размывание пика. Однако при разделении методом обращенно-фазовой хроматографии соединений типа антрацена это маловероятно.

Таблица 4-2. Взаимосвязь между объемом кюветы и чувствительностью при детектировании по флуоресценции^а

Хроматограмма	Колонка ^б	Объем кюветы (облучаемый объем), мкл	Минимальное детектируемое количество антрацена ^в (S/N = 2), пг	Минимальная детектируемая концентрация антрацена (S/N = 2), 10 ⁻⁷ %
a	ПМ	6,0 (1,5)	0,50	0,02
б	ПМ	6,0 (3,0)	0,25	0,01
в	ПМ	15,0 (7,0)	0,14	0,005
г	О	15,0 (7,0)	0,65	0,005

^а Вычислено из хроматограмм, приведенных на рис. 4-11.

^б ПМ - полумикроколонка (250 мм x 1,5 мм (внутр. диам.), насадка - силикагель с частицами размером 10 мкм, модифицированный ОДС); О - обычная колонка (250 мм x 4,6 мм (внутр. диам.), насадка та же).

^в Введенное количество.

4.3.3. Постоянная времени

Проблемы, связанные с постоянной времени, для флуоресцентного детектора те же, что и для других детекторов. Однако следует отметить, что природа шума у флуоресцентного детектора очень близка к так называемому "белому шуму", в котором в равной пропорции содержатся все частоты - от самых низких до самых высоких. Для подавления шума такого типа весьма эффективен фильтр с малым пропусканием. Если постоянная времени слишком мала, то это только увеличивает шум и снижает чувствительность. Если, наоборот, постоянная времени чересчур велика, то наблюдается размывание пиков и искажение их формы, в результате чего ухудшается точность анализа. Из изложенного следует, что постоянную времени следует тщательно выбирать, учитывая протяженность во времени измеряемого пика.

На рис. 4-12 показаны хроматограммы, полученные на одном и том же флуоресцентном детекторе, но с различными постоянными времени. Хроматограмма б (постоянная времени 2 с) идентична хроматограмме а на рис. 4-10. Хроматограмма а на рассматриваемом рисунке получена в тех же условиях, но с меньшей постоянной времени (0,2 с). При постоянной времени 2 с форма пика искажается на 5 - 10%. В то же время при увеличении постоянной времени с 0,2 до 2,0 с от-

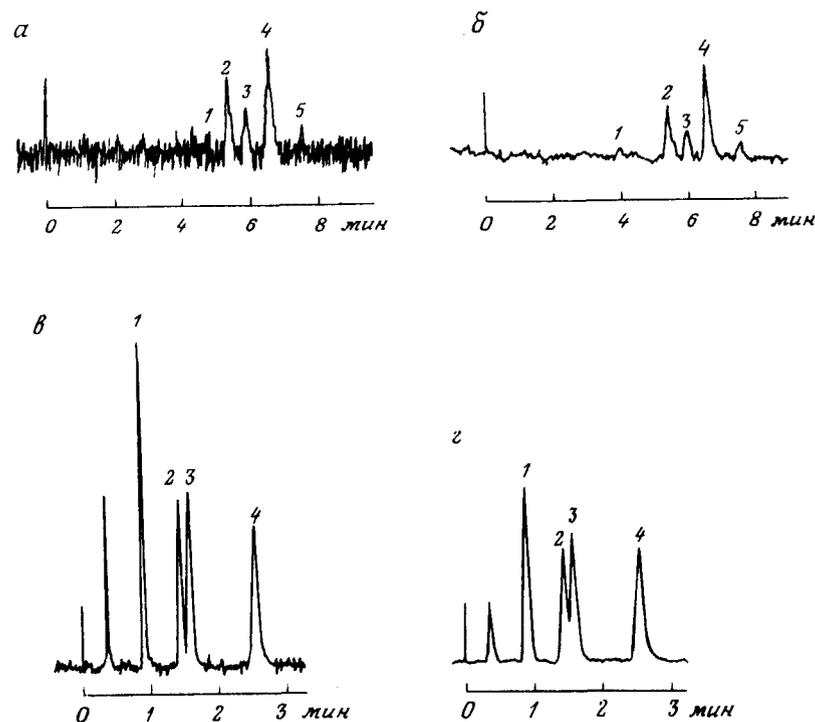


Рис. 4-12. Влияние постоянной времени детектора на форму пика и чувствительность анализа. Постоянная времени 0,2 с (а и в) и 2 с (б, г). Колонки а и б - 250 мм x 1,5 мм (внутр. диам.), неподвижная фаза Fine SIL C₁₈ (10 мкм); в и г - 4,6 мм (внутр. диам.) x 50 мм, неподвижная фаза Fine SIL C₁₈ (3 мкм). Пробы, при разделении которых получены хроматограммы а и б, те же, что и на рис. 4-10 и 4-11; хроматограммы в и г получены при разделении пробы, содержащей α-токоферол (1), β-токоферол (2), γ-токоферол (3) и δ-токоферол (4).

ношение сигнал/шум увеличивается более чем втрое. Сравнение хроматограмм в и г позволяет выявить другую закономерность. Обе эти хроматограммы получены на колонках размером 50 мм x 4,6 мм (внутр. диам.), объем которых составляет около 20% объема обычных колонок. Соответственно меньше и продолжительность анализа. Хроматограмма в (постоянная времени 0,2 с) отличается удовлетворительной формой пиков и хорошим разделением. Это справедливо даже для пиков с временем удерживания меньше 2 мин. На хроматограмме г (постоянная времени 2 с) пики с временем удерживания менее

2 мин заметно размыты. Однако для пика с временем удерживания порядка 2,5 мин размывание уже почти незаметно; в то же время отношение сигнал/шум для всех пиков заметно лучше. Таким образом, при выборе постоянной времени необходимо стремиться получить максимальную чувствительность при незначительном размывании пика определяемого соединения.

4.4. ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЕ ДЕТЕКТОРЫ

Как уже указывалось выше, основные преимущества микро- и полумикроколонок — это небольшой расход растворителя и более высокая чувствительность, обусловленная снижением объемной скорости подвижной фазы. Сочетание таких колонок с вольтамперометрическими детекторами имеет следующее преимущество: при малой объемной скорости повышается эффективность работы электродов, и даже при уменьшении объема ячейки детектора ожидать уменьшения чувствительности не приходится.

Ниже рассмотрены миниатюризованные вольтамперометрические детекторы, пригодные для полумикро- и микро-ВЭЖХ.

4.4.1. Миниатюрные одноэлектродные вольтамперометрические детекторы

Миниатюрные вольтамперометрические детекторы с одним рабочим электродом можно подразделить на два типа: с пленочной [16, 17] и с трубчатой ячейкой [18, 19]. В детекторе первого типа, описанном Гото и сотр. [16], камера ячейки изготовлена из двух фторопластовых блоков, разделенных фторопластовой же пленкой толщиной 2 - 45 мкм и шириной 0,5- 2 мм. Рабочий электрод, изготовленный из стеклоуглеродных дисков диаметром 3 мм, встроен в один из блоков. Хлоридсеребряный электрод сравнения установлен в цилиндрическом отверстии во втором блоке. Трубка из нержавеющей стали служит одновременно противозлектродом и выходной линией. Объем ячеек такого типа составляет от 0,06 до 0,3 мкл.

Описанная ячейка использовалась для детектирования изомеров аминифенола после их разделения на микроколонке размером 147 мм x 0,5 мм (внутр. диам.), заполненной силикагелем, модифицированным ОДС, при объемной скорости 8,3 мкл/мин. Пределы обнаружения исследуемых изомеров составляли около 10 пг, линейный динамический диапазон достигал 10^3 . В другом случае та же ячейка применялась для детектирования желчных кислот после их разделения на микроколон-

ке при такой же объемной скорости. По выходе из колонки определяемые компоненты обрабатывались 3α -гидроксистероидной дегидрогеназой (3α -HSD) с целью получения необходимых производных [20]. Микроколонка, на которой осуществлялось это разделение, представляла собой фторопластовую трубку размером 114 x 0,5 мм (внутр. диам), заполненную силикагелем (5 мкм), модифицированным ОДС. Реакционная колонка, установленная за разделительной колонкой, представляла собой трубку из фторопласта размером 20 мм x 0,5 мм (внутр. диам.), заполненную стеклянными шариками (200 - 400 меш) с контролируемой пористой поверхностью, модифицированных иммобилизованной HSD. 3α -Гидроксильные группы молекулы желчной кислоты окислялись в присутствии фермента до кетогруппы; в то же время β -никотинамидадениндинуклеотид (NAD) переходил в восстановленную форму (NADH), которая и детектировалась вольтамперометрически.

На рис. 4-13 изображены циклические полупроизводные и полуинтегральные вольтамперограммы NADH, полученные в фосфатном буфере (pH 7,0) при скорости развертки 100 мВ/с со стеклоуглеродным рабочим электродом. Из рисунка видно,

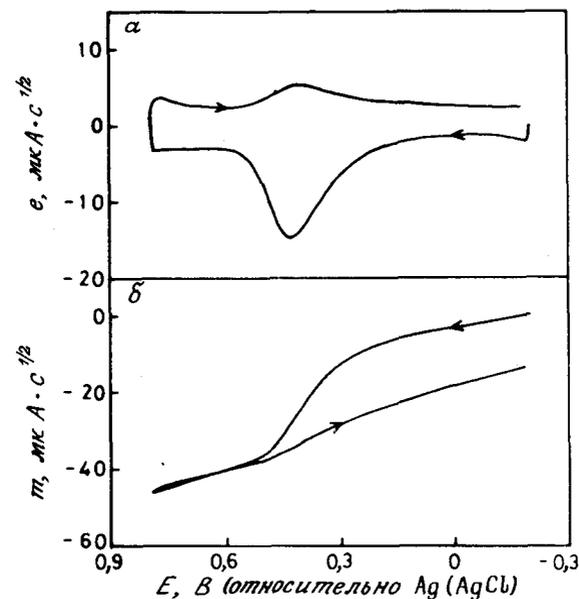


Рис. 4-13. Электрохимическое поведение NADH в фосфатном буфере (pH 7,0) на рабочем электроде из стеклоуглерода [20]. а - циклическая полупроизводная вольтамперограмма, б - циклическая полуинтегральная вольтамперограмма, е и т соответствуют полупроизводной и полуинтегралу тока по времени, Е - электродный потенциал [20] (с разрешения авторов).

что NADH электрохимически активен и необратимо окисляется в данной среде с образованием NAD. Для высокочувствительного детектирования NADH потенциал рабочего электрода детектора следует установить равным значению, соответствующему концу волны окисления в полупроизводной циклической вольтамперограмме.

На рис. 4-14 изображены типичные хроматограммы стандартных смесей свободных желчных кислот и их производных. В этих экспериментах растворы $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (30 ммоль/л), KNaHPO_4 (10 ммоль/л) и раствор NAD в ацетонитриле (4 ммоль/л) смешивали в соотношениях 48:30:22 (подвижная фаза А) и 40:30:30: (подвижная фаза В). NAD примешивали к подвижной фазе с тем, чтобы повысить чувствительность детектирования. Подвижную фазу А использовали в качестве начального элюента, который через 10 мин заменяли подвижной фазой В. Потенциал рабочего электрода устанавливали равным 0,80 В относительно серебряно-хлоридсеребряного электрода сравнения. Пределы обнаружения для свободных желчных кислот и их производных составляли примерно 0,3 - 1 нг.

В работе Хираты и сотр. [17] описана аналогичная пленочная ячейка объемом 0,15 мкл с рабочим электродом, изготовленным из прокаленного под давлением пирографита. Авторы применили эту ячейку для определения метаболитов тирозина и триптофана в моче. Разделение проводилось на микроколонке длиной 60 м, заполненной частицами пористого силикагеля (60 мкм). Разделение проводили при малой объемной скорости (1 мкл/мин). В качестве подвижной фазы использовали 0,2 М ацетатный буфер (рН 4,0). Искомые метаболиты детектировались путем измерения окислительного тока при потенциале рабочего электрода 1,00 В относительно насыщенного каломельного электрода.

Книхт и сотр. [19] разработали для капиллярной ВЭЖХ трубчатую ячейку с электродом из графитового волокна диаметром 9 мкм и длиной около 0,7 мм. Электрод с помощью микроманипулятора вводили в выходной конец капиллярной колонки 265 см x 15 мкм (внутр. диам.). Графитовое волокно помещали в специальный стеклянный кожух, заполненный электролитом (0,1 М раствором хлорида калия). В тот же электролит погружали серебряно-хлоридсеребряный электрод. Ячейку испытывали в окислительном режиме посредством простого двухэлектродного устройства. При линейной скорости элюента в интервале около 4 - 5 мм/с электролитическая эффективность системы приближалась к 100%. Пределы обнаружения для аскорбиновой кислоты, пирокатехинамина и 4-метилпирокатехинамина достигали порядка 1 фмоль/л (10^{-7} моль/л).

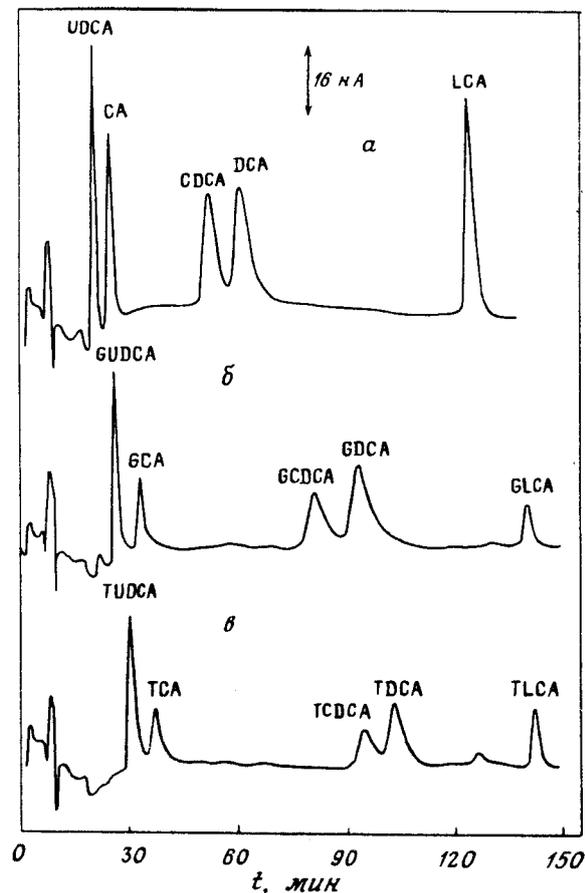


Рис. 4-14. Типичные хроматограммы стандартного раствора смеси свободных и связанных желчных кислот, полученные с помощью вольтамперометрического детектора с применением последовательной дериватизации разделенных компонентов в производные 3 α -HSD [20].

а - свободные желчные кислоты, б - конъюгаты глицина, в - конъюгаты таурина. Потенциал электрода 0,80 В относительно Ag/AgCl; подвижная фаза указана в тексте; объемная скорость 8,3 мкл/мин. Компоненты (содержание в пробе каждого из них 80 нг): UDCA - урсодезоксихолевая кислота, CA - колевая кислота, CDCA - хенодесоксихолевая кислота, DCA - дезоксихолевая кислота, LCA - литохолевая кислота, GUDCA - гликоурсодезоксихолевая кислота, GCA - гликохолевая кислота, GCDCA - гликохенодесоксихолевая кислота, GCA - гликохенодесоксихолевая кислота, CLCA - гликолитохолевая кислота, TUDCA - тауроурсодезоксихолевая кислота, TCA - таурохолевая кислота, TCDCA - таурохенодесоксихолевая кислота, TDCA - тауродезоксихолевая кислота, TLCA - тауролитохолевая кислота.

Рубчатая ячейка для микроколонок, разработанная Гото и сотр. [18], изображена на рис. 4-15. Графитовое волокно диаметром 7 мкм и длиной 15 мм, служащее рабочим электродом, вводится в трубку из кварцевого стекла внутренним диаметром 50 мкм. Другой конец трубки соединяется с выходом хроматографической микроколонок. Элюат вытекает через отверстие диаметром 1 мм, просверленное в стенке фторопластовой трубки. Серебряно-хлоридсеребряный электрод сравнения и платиновый противозлектрод помещают в каплю раствора электролита, находящегося вблизи выхода элюата. Описанную ячейку использовали для детектирования катехоламинов, которые разделялись на микроклонке из кварцевого стекла размером 50 мм x 0,35 мм (внутр. диам.), заполненной частицами кремнезема (3 мкм), модифицированного ОДС. На рис. 4-16 представлена типичная хроматограмма стандартного раствора. Пределы обнаружения для каждого из четырех катехоламинов составляли примерно 1-3 пг, линейный динамический диапазон достигал 10^3 .

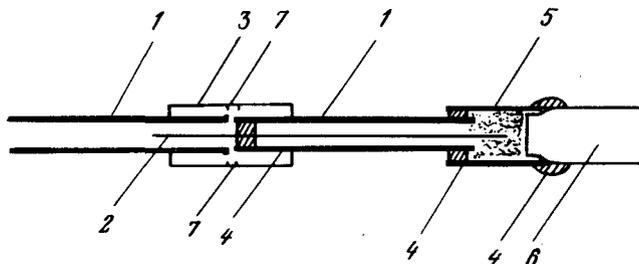


Рис. 4-15. Трубчатая ячейка с электродом, изготовленным из углеродного волокна [18] (с разрешения авторов).

1 - трубка из кварцевого стекла (внутр. диам. 50 мкм); 2 - углеродное волокно (диаметр 7 мкм), 3 - трубка из ПТФЭ, 4 - склеивающая смола, 5 - углеродная паста, 6 - электрический привод, 7 - отверстие.

4.4.2. Миниатюрные двухэлектродные вольтамперометрические детекторы

Пока мы располагаем описанием только миниатюрных двухэлектродных вольтамперометрических детекторов с ячейкой пленочного типа. Эти детекторы можно подразделить на два вида в зависимости от того, последовательно или параллельно располагаются рабочие электроды по отношению к направлению потока элюата [21]. При последовательной конфигурации

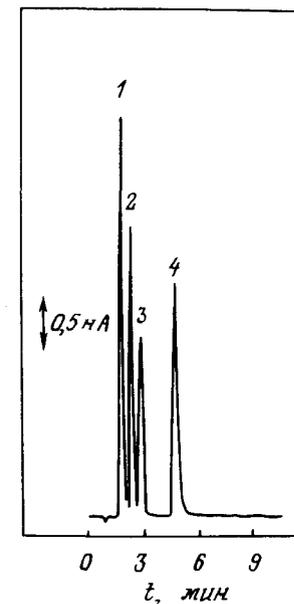


Рис. 4-16. Типичная хроматограмма стандартного раствора четырех катехоламинов, полученная с применением вольтамперометрического детектора с трубчатой ячейкой из кварцевого стекла [18] (с разрешения авторов). Колонка 50 мм x 0,35 мм (внутр. диам.), неподвижная фаза кремнезем, модифицированный ОДС (3 мкм); подвижная фаза метанол/фосфатный буфер (pH 3,0), содержащий 0,4 ммоль/л 1-октилсульфоната и 0,2 ммоль/л ЭДТА (1:9); объемная скорость 4,8 мкл/мин.

Пики (содержание каждого компонента в пробе 100 пг): 1 - норадреналин, 2 - адреналин, 3 - дофа, 4 - дофамин.

рабочие электроды устанавливаются один за другим вдоль по тока на одной стенке трубки. При параллельной же конфигурации они устанавливаются один против другого на противоположных стенках трубки.

Вольтамперометрический детектор с последовательной конфигурацией электродов аналогичен флуоресцентному. При этом продукт реакции, образовавшийся на рабочем электроде, расположенном выше, детектируется вторым электродом, расположенным ниже. Гото и сотр. [22] сконструировали субмикролитровую пленочную ячейку с двумя стеклогуглеродными электродами, расположенными последовательно. Эта ячейка была успешно использована для селективного детектирования катехоламинов, индоламина и их метаболитов в моче человека. Детектирование основывалось на электрохимической обратимости указанных соединений [21-23]. На рис. 4-17 показаны хроматограммы катехоламиновых метаболитов, содержащихся в моче двух здоровых людей. Разделение проводилось на микроклонке, заполненной кремнеземом, модифицированным ОДС, с применением детектора с последовательной конфигурацией электродов [24]. Пробу мочи подкисляли, вводили гидрохинон в качестве внутреннего стандарта и экстрагировали этилацета-

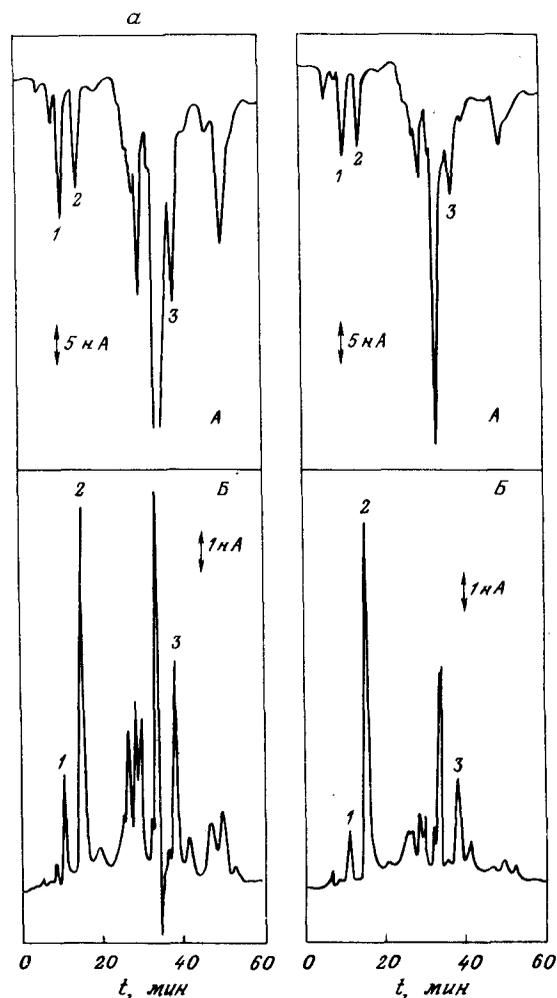


Рис. 4-17. Селективное детектирование метаболитов катехоламина в моче двух здоровых людей (а, б) с применением вольтамперометрического детектора с последовательно расположенными электродами [24] (с разрешения авторов). А - анодный сигнал, Б - катодный сигнал. Потенциалы (относительно Ag/AgCl) анодный +0,90 В, катодный -0,05 В. Колонка 154 мм x 0,5 мм (внутр. диам.); неподвижная фаза кремнезем, модифицированный ОДС (5 мкм); подвижная фаза метанол/фосфатный буфер (0,1 моль/л, рН 3,6), содержащий 0,1 ммоль/л ЭДТА (концентрация метанола через 23 мин после начала опыта резко повышалась с 5 до 25%); объемная скорость 5,6 мкл/мин.

Пики: 1 - ванилилминдальная кислота, 2 - гидрохинон (внутренний стандарт), 3 - гомованилиновая кислота.

том. Органическую фазу выпаривали досуха в потоке азота, остаток растворяли в подвижной фазе и пробу полученного раствора объемом 0,3 мкл вводили в хроматографическую колонку. На рис. 4-17 приведены анодные хроматограммы, полученные с помощью верхнего (расположенного выше) рабочего электрода (А), и катодные хроматограммы, полученные с помощью нижнего рабочего электрода (Б). В части А наибольший интерес представляют пики примесей, выходящие вблизи пика гомованилиновой кислоты. Путем регистрации тока повторного восстановления эти пики, мешающие определению, можно устранить (см. часть Б) благодаря электрохимической необратимости соответствующих им соединений. Из рисунка видно, что ванилилминдальная и гомованилиновая кислоты в моче успешно определяются при совместном их присутствии.

Двойной вольтамперометрический детектор с параллельной конфигурацией электродов аналогичен трубке фотоумножителя. Продукт реакции, образующийся на одном из рабочих электродов, может диффундировать к противоположному рабочему электроду, на котором может вновь образовываться исходное вещество. Гото и сотр. [25, 26] сконструировали пленочную ячейку с двумя параллельными стеклографитовыми электродами, каждый шириной 2 мм и длиной 1 см. При малых объемных скоростях удавалось осуществить каталитическое усиление сигнала детектора для веществ, способных к обратимым электродным реакциям. Усиление достигалось благодаря циркуляции редокс-пары между двумя рабочими электродами. Усиление ячейки по току исследовали при малых объемных скоростях в буфере Бриттона - Робинсона (рН 1,8) с применением феррицианида в качестве определяемого компонента. С уменьшением объемной скорости с 11,2 до 1,4 мкл/мин коэффициент усиления возрастал с 2,4 до 19,5. Описанная ячейка успешно применялась для селективного и чувствительного детектирования катехоламинов в сыворотке крови человека. Разделение проводилось на микроколонке 150 мм x 0,5 мм (внутр. диам.), заполненной кремнеземом, модифицированным ОДС [26]. В этом случае потенциал верхнего рабочего электрода (относительно Ag/AgCl) устанавливался равным +0,60 В, а потенциал нижнего электрода - равным +0,20 В. Предел обнаружения катехоламинов составлял около 3 пг; при нормальном их содержании в сыворотке крови человека для одного определения достаточно пробы объемом 200 мкл [26].

ЛИТЕРАТУРА

1. Snyder L.R., Kirkland J.J. Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2nd ed., Wiley-Interscience, 1979, p. 126.
2. Ishii D., Asai K., Hibi K., Jonokuchi T., Nagaya M. J.Chromatogr., 1977, 144, 157.
3. Scott R.P.W., Kucera P. J.Chromatogr., 1979, 169, 51.
4. International Chromatography Guide, J. Chromatogr. Sci., 1986, 24, 1G.
5. 1986 Buyers' Guide Edition, International Laboratory: 1986.
6. Takeuchi T., Ishii D., Saito M., Hibi K. J.Chromatogr., 1984, 295, 323.
7. Yang F.R. J. Chromatogr., 1982, 236, 265.
8. Nagoshi T. Faculty of Materials Science, Toyohashi University of Technology, частное сообщение, 1985.
9. Saito M., Wada A., Hibi K., Takahashi M. Industrial Research/Development, 1983, Apr., p.102.
10. Kucera P., Umagat H. J. Chromatogr., 1983, 255, 563.
11. Takeuchi T., Saito S., Ishii D. J.Chromatogr., 1983, 258, 125.
12. Schoeffel D. M., Sonnenschein A. K. US Patent 4 088 407, 1978.
13. Weinberger R., Sapp E. International Laboratory, 1984, Sep., p.80
14. Kucera P. In Microcolumn High-Performance Liquid Chromatography, Elsevier, Amsterdam, 1984, p.70.
15. Hatano H., Yamamoto Y., Saito M., Mochida E., Watanabe S. J.Chromatogr., 1973, 83, 117.
16. Goto M., Koyanagi Y., Ishii D. J. Chromatogr., 1981, 208, 261.
17. Hirata Y., Lin P.T., Novotny M.V., Wightman R.M. J. Chromatogr., 1980, 181, 287.
18. Goto M., Shimada K., Ishii D. Abstracts of Papers, 10th Discussion Meeting for HPLC, HPLC Discussion Committee, Nagoya, Japan, Jan. 9, 1985, Abstr. 7.
19. Knecht A.L., Guthrie E.J., Jorgenson J.W. Anal. Chem., 1984, 56, 479.
20. Goto M., Kawaguchi Y., Ishii D. Abstracts of Papers, 44th Discussion Meeting of Analytical Chemistry, Japan Society for Analytical Chemistry, Nagasaki, Japan, Jun. 6-7, 1983, Abstr. 1A12T.
21. Goto M., Sakurai E., Ishii D. J. Liq. Chromatogr., 1983, 6, 1907.
22. Goto M., Nakamura T., Ishii D. J. Chromatogr., 1981, 226, 33.
23. Goto M., Sakurai E., Ishii D. J. Chromatogr., 1982, 238, 357.
24. Goto M., Sakurai E., Ishii D. Abstracts of Papers, 32th Annual meeting of the Japan Society for Analytical Chemistry, Niigata, Japan, Oct. 3-7, 1983, Abstr. 3A05.
25. Goto M., Zou G., Ishii D. J. Chromatogr., 1983, 268, 157.
26. Goto M., Zou G., Ishii D. J. Chromatogr., 1983, 275, 271.

5. КОМБИНИРОВАННЫЕ СИСТЕМЫ, СОЧЕТАЮЩИЕ МИКРО-ВЭЖХ И ДРУГИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

К. Джинно, С. Цуге*

5.1. МИКРОКОЛОНОЧНАЯ ВЭЖХ - ИК-СПЕКТРОСКОПИЯ

5.1.1. Введение

Большинство химических соединений способны поглощать энергию в средней части инфракрасной области электромагнитного спектра, и это обстоятельство можно использовать для их идентификации. Ни один из получивших распространение в ЖХ детекторов не дает информации о строении хроматографируемых веществ, и поэтому было бы весьма удобно ввести в ЖХ-систему ИК-спектрометр в качестве детектора, пригодного как для неселективного, так и для специфического детектирования многих соединений.

Однако, как выяснилось, сочетать ЖХ-систему с ИК-спектрометром в одном приборе чрезвычайно трудно. По сравнению с описанными ранее методами детектирования по поглощению света поглощение в ИК-области происходит относительно слабо, и для получения приемлемого ИК-спектра необходимо по меньшей мере несколько сотен нанogramмов вещества. Кроме того, многие растворители, выполняющие роль компонентов подвижной фазы, настолько сильно поглощают в средней ИК-области, что на некоторых участках спектра они являются практически непрозрачными. Чтобы обеспечить пропускание, достаточно высокое для наблюдения полос поглощения определяемого вещества на большей части спектра (хотя бы на 40% представляющих интерес частот), необходима кювета с малой длиной пробега луча, обычно не более 100 мкм. Если попытаться увеличить длину пробега с тем, чтобы повысить чувствительность детектирования, то предел обнаружения может при этом, наоборот, увеличиться из-за увеличения поглощения в органическом растворителе. Таким образом, приходится искать оптимальное соотношение между толщиной кюветы

* K. Jinno, School of Material Science, Toyohashi University of Technology, Toyoshi 440, Japan. S. Tsuge, Department of Synthetic Chemistry, Faculty of Engineering, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya 464, Japan

и пропусканием растворителя на всех длинах волн, представляющих интерес для анализа.

Несмотря на все сложности, возможность сочетания ЖХ с ИК-спектроскопией изучалась многими авторами. В результате были разработаны два принципиально различных подхода. В одном из них выходящий из колонки элюат предполагается непосредственно направлять в проточную кювету. В другом предусматривается предварительное удаление растворителя. В обоих случаях основным ограничением является большая объемная скорость подвижной фазы, применяемая в обычной ЖХ (для колонки с внутренним диаметром 4,6 мм она достигает 1 мл/мин). При использовании проточной кюветы концентрация примесных компонентов даже в максимумах пиков обычно много ниже пределов обнаружения методом ИК-спектроскопии. Это объясняется отчасти ухудшением пропускания в тех областях спектра, где имеется заметное поглощение ИК-излучения компонентами подвижной фазы, и отчасти малым количеством компонента, присутствующего в проточной кювете во время проведения измерений. Чтобы можно было испарить растворитель, компоненты подвижной фазы должны быть более летучи, чем хроматографируемые соединения. (Кроме того, образование больших количеств паров растворителя опасно для окружающей среды и требует принятия специальных мер).

Микроколоночная ЖХ позволяет при той же линейной скорости подвижной фазы, но с гораздо меньшим ее расходом получить примерно ту же эффективность разделения, что и на обычных колонках с внутренним диаметром 4,6 мм и с теми же насадочными материалами. Микроколоночки обычно работают при объемных скоростях подвижной фазы от 1 до 100 мкл/мин. Такие малые объемные скорости уже допускают непосредственно сопряжение жидкостного хроматографа с рядом спектрометрических детектирующих систем. Кроме того, уменьшение расхода элюента позволяет выбирать в качестве такового дорогостоящие растворители. При малых объемных скоростях подвижных фаз увеличивается концентрация примесных компонентов в пиках, а благодаря возможности применения дейтерированных растворителей некоторые проблемы, мешающие использованию систем ЖХ-ИКС с проточными кюветами, полностью исчезают или их решение существенно упрощается. В системах, предусматривающих удаление растворителя на выходе элюата из колонки, микроколоночная ЖХ также более предпочтительна, поскольку вследствие малой объемной скорости элюата легче осуществить удаление растворителей, мешающих детектированию.

В настоящем разделе рассмотрены новейшие методы сопряжения микроколоночного жидкостного хроматографа с ИК-спектрометром и подчеркнуты преимущества работы именно с

малыми колонками. Что касается ИК-спектрометров, то несомненными преимуществами обладают инфракрасные фурье-спектрометры (ИКФС), имеющие очень малые времена развертки, системы для усреднения сигнала и для вычитания одного спектра из другого. Поэтому обычно считают, что ИКФС лучше подходит для сопряжения с жидкостным хроматографом. Однако очень высокая по сравнению с обычным ИК-спектрометром стоимость ИКФС нередко препятствует широкому распространению последних. Рабочие характеристики ИКФС несомненно лучше, чем у обычного ИК-спектрометра, но в сочетании с жидкостным хроматографом никакого различия между ИКФС и обычным ИК-спектрометром не наблюдается. Поэтому все нижеследующие рассуждения в равной мере справедливы и для того, и для другого прибора.

5.1.2. Метод проточной кюветы

Для проведения ЖХ-анализа с детектированием разделенных компонентов в реальном масштабе времени пригоден только метод проточной кюветы. К сожалению, наиболее популярные в ЖХ растворители сильно поглощают в средней части ИК-области спектра, потому использование данного метода связано с большими трудностями. Для успешного сочетания ЖХ-системы с ИК-спектрометром с детектированием в проточной кювете приходится решать целый ряд проблем. Прежде всего нужно выбрать подходящие компоненты неподвижной фазы. Для мониторинга в ИК-области спектра предпочтительнее кюветы с малым объемом, но с большой длиной пробега луча. Однако в то же время, для уменьшения помех, оказываемых растворителем, длину пробега луча желательно уменьшить. При этом для компенсации потери чувствительности необходимо либо увеличить массу вводимой в колонку пробы, либо выбрать более чувствительную систему детектирования. Поскольку при увеличении пробы можно перегрузить колонку, а усовершенствовать оптическую систему детектирующего спектрометра трудно, то остается выбирать наиболее прозрачные растворители и проточную кювету с оптимальной длиной пробега луча. Эти проблемы рашаются очень просто, и поэтому осуществить прямое сопряжение ЖХ-системы с ИК-спектрометром посредством проточной кюветы обычно достаточно сложно.

Если необходимо детектировать только те компоненты, которые содержат в молекуле группы С-Н и/или С=Н (характерные почти для всех органических соединений), выбор растворителей достаточно велик. Правда, препятствием может послужить их высокая стоимость, как, например, в случае дейтерированных или полностью галогенированных соединений. В

то же время в микроколоночной ЖХ эти дорогие, но дающие хорошие результаты растворители становятся более доступными из-за их меньшего расхода [1-2].

Вторая проблема связана с конструкционным материалом проточной ячейки. Для большинства органических растворителей, выполняющих роль подвижной фазы, оптимальным материалом для изготовления кювет являются соли щелочных металлов, в том числе NaCl, KBr, CsBr и CsI. Для работы с водными элюентами кюветы изготавливают из таких материалов, как ZnS, AgCl и KRS-5, однако они имеют более высокий коэффициент преломления и, как следствие, худшее пропускание, а поэтому при измерениях труднее избавиться от помех. Хорошим материалом является также ПТФЭ, который совместим с большинством исследуемых веществ и возможных растворителей [3]. Проточные кюветы для обычной и микроколоночной ЖХ-ИКС изготавливают из одних и тех же материалов. Однако в последнем случае можно работать с кюветами с меньшей длиной пробега луча и достигать меньших пределов обнаружения благодаря повышению концентрации определяемого компонента в максимуме пика.

Третьей важной проблемой в ЖХ-ИКС является фокусировка луча. Если ИК-спектрометр не подвергался какой-либо модификации, никакой особой юстировки не требуется и измерение проводится обычным способом в камере для установки кюветы. Однако в ряде случаев чувствительность обычного ИК-спектрометра может оказаться недостаточной. Поэтому для повышения чувствительности или поддержания ее на достаточно высоком уровне иногда прибегают к фокусирующей оптике. Обычно для этого пригодны коммерческие оптические конденсоры. Причем при малых размерах колонок эти устройства приспособить легче, чем при использовании обычных колонок.

Из всего сказанного следует, что микроколоночный жидкостный хроматограф лучше всего подходит для прямого сопряжения с ИК-спектрометром с проточной кюветой. Далее мы рассмотрим несколько типичных примеров применения такой системы.

В адсорбционной, или нормально-фазовой, хроматографии насыщенные и циклические алканы часто выполняют роль основных растворителей, к которым в качестве регуляторов удерживания добавляют небольшие количества полярных соединений. Однако все они сильно поглощают в средней части ИК-области спектра. Исключение составляют только полностью фторированные или хлорированные углеводороды, но их применение ограничено из-за небольшого диапазона полярности и высокой стоимости. На рис. 5-1 приведена трехмерная хроматограмма смеси 5 α -холестана, 5 α -холестан-3-она и холестерина-

на, полученная по методу ИКФС на силикагеле со смесью дейтероциклогексана, дейтерохлороформа и тетрадейтерометанола в качестве подвижной фазы. Выходящие из колонки компоненты можно идентифицировать по характеристическим линиям поглощения в ИК-области. При этом полосы поглощения, соответствующие группам C-D и C-C, определению не мешали.

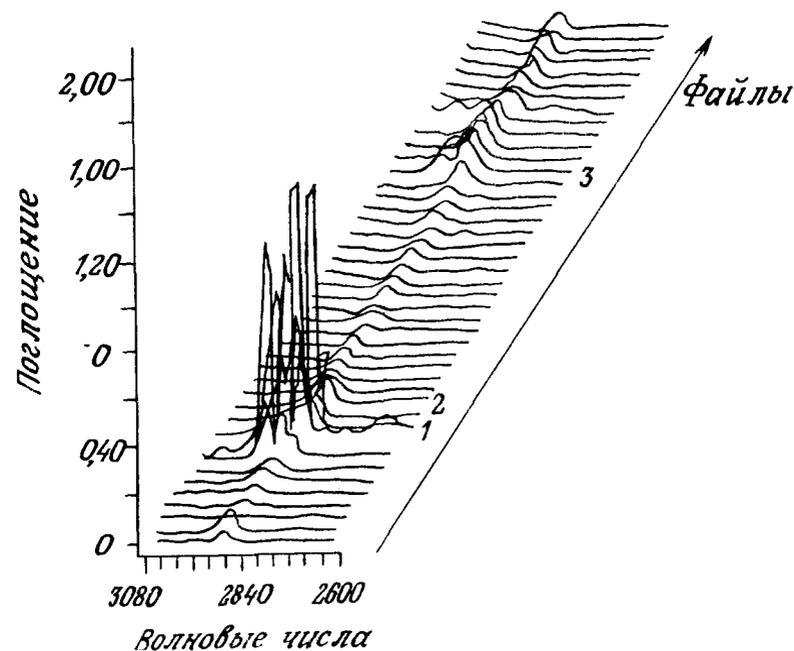


Рис. 5-1. Нормально-фазовое разделение стероидов с мониторингом посредством ИКФС. Колонка 0,5 мм (внутр. диам.); неподвижная фаза JASCO Fine SIL-5 (кремневая кислота, размер частиц 5 мкм); подвижная фаза D₁₂-циклогексан/D₁-хлороформ/D₄-метанол (90,3/9,1/0,6 по объему); детектор ИКФС, накопление десятикратное (JEOL JIR-40X).

Пики: 1 - 5 α -холестан, 2 - 5 α -холестан-3-он, 3 - холестерин.

На рис. 5-2 показана хроматограмма смеси двух алканов, разделение которых проводилось методом нормально-фазовой хроматографии и контролировалось по поглощению на частоте деформационных колебаний связи C-H. Подвижной фазой служил перфторуглеродный растворитель FC-78. При использовании в качестве элюента обычных органических растворителей получить хроматограмму на той же частоте поглощения было невозможно.

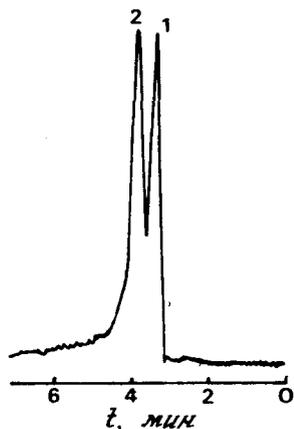


Рис. 5-2. Нормально-фазовое разделение алканов с применением ИК-спектрометра в качестве детектора. Колонка 60 мм x 0,5 мм (внутр. диам.); неподвижная фаза JASCO SS-05

На рис. 5-3 и 5-4 даны хроматограммы, полученные в обращенно-фазовом режиме. Известно, что применяемые при этом сильнополярные растворители (вода, метанол, ацетонитрил) поглощают ИК-излучение гораздо сильнее, чем органические растворители, которыми пользуются в нормально-фазовой жидкостной хроматографии. Однако, хотя многие представляющие интерес области спектра при этом маскируются полосами поглощения элюента, все же использование микроколонок и дейтерированных растворителей позволяет зарегистрировать полосы деформационных колебаний связей С-Н и С-О [1-3].

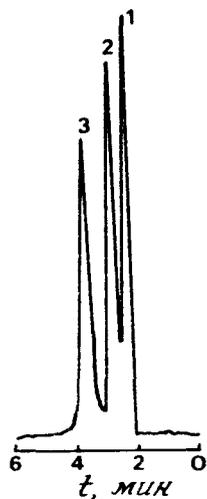


Рис. 5-3. Обращенно-фазовое разделение жирных кислот с ИК-спектрометром в качестве детектора. Колонка 90 мм x 0,5 мм (внутр. диам.); неподвижная фаза хемкосорб ODS-H (7 мкм; Chemco, Osaka, Japan); подвижная фаза CD_3CN ; объемная скорость 16 мкл/мин; детектор ИК-спектрометр, 2937 см^{-1} .

Пики: 1 - каприловая кислота, 2 - капроновая кислота, 3 - лауриновая кислота.

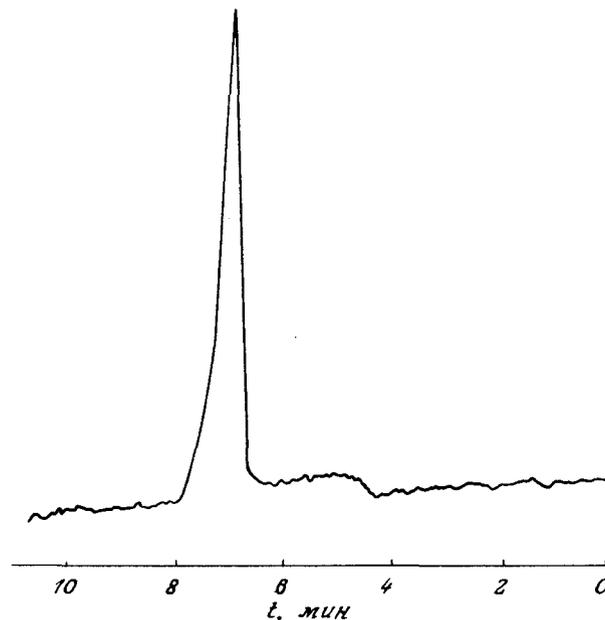


Рис. 5-4. Определение 1-пропанола методом обращенно-фазовой ЖХ с ИК-спектрометром в качестве детектора. Колонка 90 мм x 0,5 мм (внутр. диам.); неподвижная фаза ODS-H (7 мкм; Chemco); подвижная фаза D_2O ; объемная скорость 4 мкл/мин; детектор ИК-спектрометр, 3000 см^{-1} .

На рис. 5-3 показана хроматограмма трех органических кислот, элюирование которых проводилось CD_3CN . Детектирование осуществлялось на частоте деформационных колебаний связи С-Н. Еще один пример такого разделения приведен на рис. 5-4, где изображена хроматограмма пропанола, полученная в обращенно-фазовом режиме при элюировании D_2O .

Приведенные примеры показывают, что прямое детектирование в ЖХ посредством ИК-спектрометра с проточной кюветой возможно при использовании микроколонок и подвижных фаз, состоящих из дейтерированных или перфторированных растворителей. Применению таких растворителей при разделении на обычных колонках препятствует их высокая стоимость.

5.1.3. Метод удаления растворителя

Все проблемы, затрудняющие использование системы ЖХ-ИКС с проточной кюветой, легко решаются, если удалить из системы весь растворитель непосредственно перед измерением

поглощения ИК-излучения. Наиболее удачный пример применения такого подхода описан в 1979 г. [4]. Авторами этой статьи разработано устройство, в котором выходящий из колонки элюат концентрируется и по каплям наносится на порошок хлорида калия. Оставшийся растворитель быстро испаряется, и на КСl остается только определяемое вещество. После этого можно снять его спектр отражения. В 1980 г. Кюль и Гриффитс [5] усовершенствовали данный метод, введя в систему микрокомпьютер [5].

Хотя удаление растворителя, по-видимому, позволяет устранить все трудности, связанные с использованием проточной кюветы в комбинации ЖХ-ИКС, некоторые ограничения все-таки остаются. Во-первых, определяемые вещества должны быть гораздо менее летучими, чем подвижная фаза. Во-вторых, воду удалить очень трудно из-за ее высокого поверхностного натяжения и большой скрытой теплоты испарения. Первая проблема, однако, не имеет большого значения для ЖХ, поскольку летучие соединения обычно успешно разделяются газохроматографически. Таким образом, наиболее трудной проблемой является удаление воды.

Первые результаты исследования системы ЖХ-ИКС с использованием метода удаления растворителя описаны в 1982 г. Джинно и сотр. [6, 7] и Фудзимото и сотр. [8]. Выходящие из колонки компоненты осаждались на кристаллической пластинке бромиде калия, которая служила в качестве "буферной

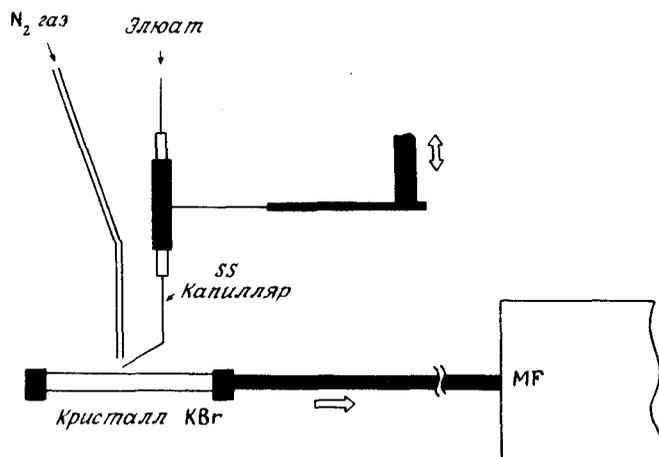


Рис. 5-5. Сопряжение жидкостной хроматографической микроколонки с ИК-спектрометром при использовании метода полного удаления растворителя (MF - микроманипулятор MF-2; Azuma Electric, Tokyo, Japan).

памяти". После завершения элюирования пластинка автоматически переносилась в ИК-спектрометр, где непрерывно регистрировался спектр пропускания той части пластинки, на которой осаждались разделенные компоненты. Пределы обнаружения лежали в интервале от 100 нг до 1 мкг, никаких помех от растворителей не наблюдалось.

Использованное в работе устройство схематически изображено на рис. 5-5. Выходящий из микроколонки элюат наносился на кристаллическую пластинку бромиде калия, которая медленно двигалась перпендикулярно выходной трубке, изготовленной из нержавеющей стали. Растворитель удалялся в потоке нагретого азота, скорость перемещения пластинки регулировалась в зависимости от условий хроматографического опыта. Далее пластинку помещали в луч ИК-излучения. На рис. 5-6 представлена фотография пластинки из KBr с нанесенными на нее веществами, а на рис. 5-7 - взаимное расположение частей описанной установки.

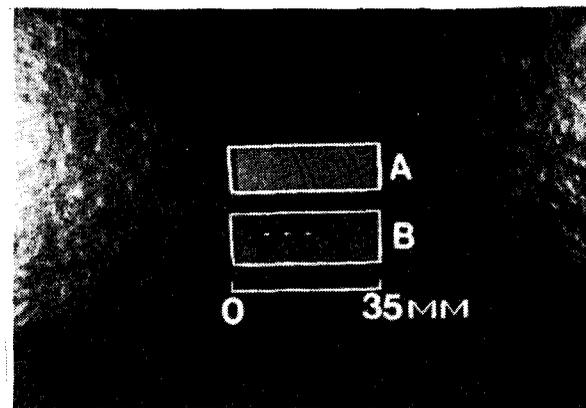


Рис. 5-6. Пластина бромиде калия для "буферной памяти". А - осажденный на пластинке ди-н-пропилкетон-2,4-динитрофенилгидразон. Слева направо 1, 3, 4 и 6 мкг. Б - осажденный на пластинке ди-н-пропилкетон-2,4-динитрофенилгидразон (2 мкг x 5).

Поскольку органические растворители, обычно применяемые в качестве подвижных фаз в нормально-фазовой и эксклюзионной хроматографии, отличаются высокой летучестью, метод удаления растворителя, или метод "буферной памяти", дает особенно хорошие результаты именно в этих видах хроматографии. Для демонстрации метода "буферной памяти" на микроколонке была разделена смесь, составленная из трех по-

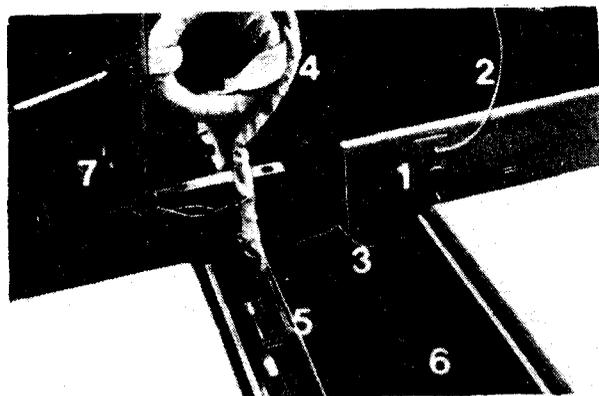


Рис. 5-7. "Буферная память". 1 - УФ-детектор, 2 - колонка, 3 - соединительная трубка, 4 - нагреватель струи газообразного азота, 5 - кристаллическая пластинка бромид калия, 6 - ИК-спектрометр, 7 - микроманипулятор.

листирольных стандартов. Полученная хроматограмма (рис. 5.8), снятая при частоте 698 см^{-1} , вполне удовлетворительна, помехи от растворителя отсутствуют.

Если коллекторами служат соли щелочных металлов, удаление воды представляет серьезную проблему. Однако в обращенно-фазовой хроматографии коллектором может служить не бромид калия, а сетка из нержавеющей стали.

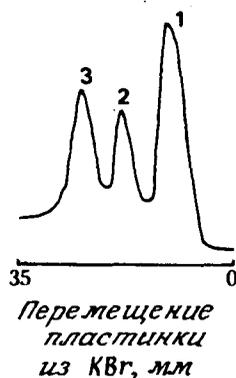


Рис. 5-8. Разделение полистирольных стандартов методом эксклюзионной хроматографии с помощью метода "буферной памяти". Колонка 220 мм x 1 мм (внутр. диам.); неподвижная фаза Тоуо Soda TSK GeL-G3000H; подвижная фаза ТГФ; объемная скорость 8 мкл/мин; детектор ИК-спектрометр, 698 см^{-1} . Пики: 1 - мол. масса 37000, 2 - мол. масса 10200, 3 - мол. масса 2800.

На рис. 5-9 изображена трехмерная хроматограмма смеси кофеина, аспирина и фенацетина, полученная посредством ИКФС; никаких помех от растворителей, входивших в состав применявшейся подвижной фазы (метанола и воды), на хроматограмме не наблюдается. Этот пример убедительно доказывает, что метод "буферной памяти" можно считать универсальным способом, обеспечивающим сопряжение микроколоночной ЖХ-системы с ИК-спектрометром как для адсорбционного, так и для обращенно-фазового вариантов хроматографии.

Из вышеизложенного очевидно, что ИК-детектирование может быть использовано для определения веществ, разделенных методом ЖХ, причем при детектировании на характеристических частотах можно добиться высокой селективности. В большинстве случаев удовлетворительные результаты могут быть получены посредством более простой и гораздо более дешевой системы с микроколонок. Единственным серьезным недостатком этой системы является ее относительно невысокая чувствительность.

5.2. МИКРОКОЛОНОЧНАЯ ВЭЖХ - МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ (МС)

5.2.1. Введение

Комбинация ВЭЖХ-МС изучена весьма подробно [9 - 18]. Хотя некоторые типы таких систем в настоящее время производятся серийно и описано немало многообещающих достижений в этой области, следует признать, что сочетание ВЭЖХ-МС еще не настолько хорошо разработано, чтобы им можно было широко пользоваться. Это объясняется тем, что создание практически пригодной системы ВЭЖХ-МС - задача намного более сложная, чем создание системы ГХ-МС. Прежде всего в этом случае необходимо осуществить непрерывное равномерное испарение термически лабильных и/или нелетучих молекул определяемых веществ из хроматографического элюата с последующей мягкой ионизацией и масс-спектрометрическим разделением полученных ионов. Далее, в обычные масс-спектрометры нельзя вводить большие количества летучих растворителей и тем более буферных растворов, а при применении обычных колонок для ВЭЖХ объемная скорость достигает 1 мл/мин. Однако при использовании насадочных или безнасадочных капиллярных колонок решение задачи существенно упрощается, поскольку благодаря значительному снижению объемной скорости часто достаточно лишь несколько модифицировать систему, чтобы обеспечить возможность ввода всего выходящего из колонки элюата непосредственно в масс-спектрометр.

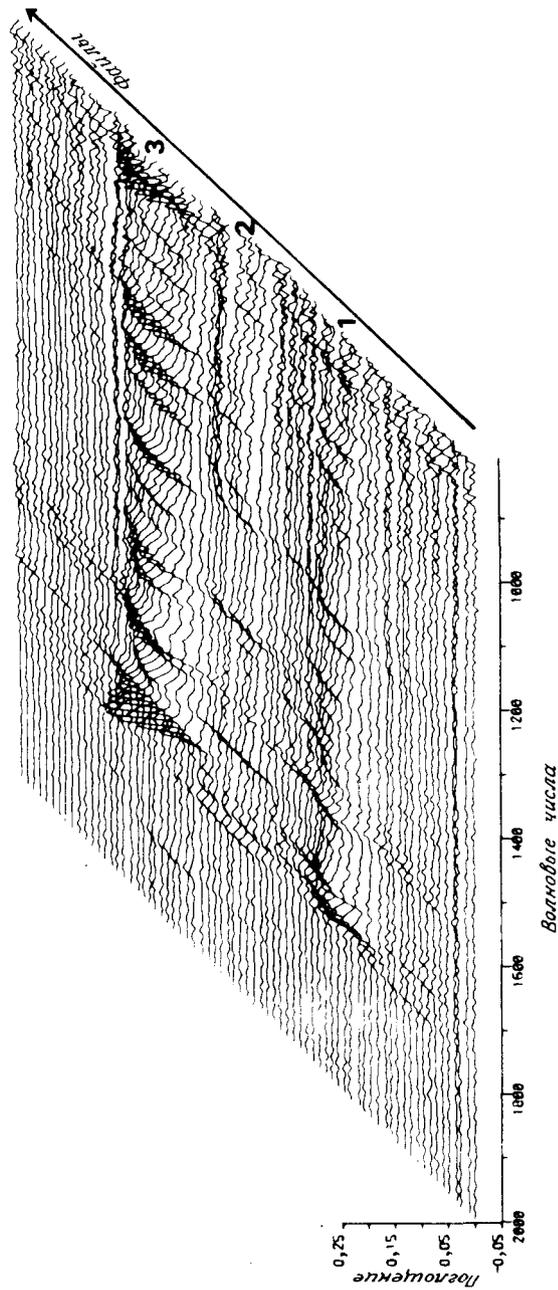


Рис. 5-9. Разделение кофеина, аспирина и фенацетина методом обращенно-фазовой хроматографии с проведением мониторинга при помощи ИК-фурье-спектрометра по методу "буферной памяти". Колонка 250 мм \times 0,5 мм (внутр. диам.); неподвижная фаза Nippona Chemicals Develosil ODS-10 (10 мкл.; Seto, Japan); подвижная фаза метанол/вода (60/40); объемная скорость 4 мкл/мин; детектор ИКФС JEOL JIR-40X; накопление 100 циклов. Пики: 1 - кофеин, 2 - аспирин, 3 - фенацетин.

В настоящее время чаще всего используются два метода сопряжения ВЭЖХ с масс-спектрометром: метод механического переноса (посредством движущейся ленты) и метод прямого ввода. Последний насчитывает много вариантов: ввод через диафрагму с малым отверстием, через длинный капилляр, распыление в вакууме с обогащением, термовпрыскивание и пр.

В данной главе рассматриваются основные принципы типичных методов сочетания ВЭЖХ-МС и примеры их применения. Основное внимание при этом уделено микро-ВЭЖХ.

5.2.2. Метод механического переноса

На рис. 5-10 приведена схема типичной системы ВЭЖХ-МС с движущейся лентой, выпускаемой фирмой Finigan [19]. Элюат, выходящий из хроматографической колонки, непрерывно наносится на движущуюся полиимидную ленту (фирмы Кар) шириной 3 мм. После испарения растворителя лента протягивается через вакуумноплотные сальники с постоянной скоростью (2 - 3 см/с) в ионизационную камеру, где исследуемые компоненты пробы, оставшиеся на ленте, быстро испаряются под воздействием электрического нагревателя. Остатки анализируемых веществ удаляются с ленты при помощи второго нагревателя. Ионизация анализируемых веществ осуществляется как методом электронного удара, так и химически. Однако в некоторых случаях возникают серьезные трудности вследствие термического разложения термолабильных веществ на ленте еще в процессе удаления растворителя. Емкость ленты по отношению к растворителю изменяется в зависимости от природы последнего. При больших объемных скоростях иногда удается добиться хороших результатов, прибегая к делению потока. При увеличении содержания воды в подвижной фазе емкость ленты уменьшается и может достигать всего 0,05 мл/мин. В таких случаях более эффективно нанесение пробы на ленту в виде аэрозоля [20].

На рис. 5-11 изображена типичная масс-хроматограмма, полученная на установке ВЭЖХ-МС с движущейся лентой. В данном случае в колонке проводилось обращенно-фазовое разделение антибиотиков (спектиномицина и актинамина) с применением градиентного элюирования. Детектирование осуществлялось посредством масс-спектрометра с метановой химической ионизацией [19].

В статье Каргера и сотр. [21] описано применение системы ВЭЖХ-МС с механическим переносом пробы в сочетании с жидкостной экстракцией для анализа различных малолетучих соединений, в том числе жирных кислот, спиртов, аминов и пестицидов.

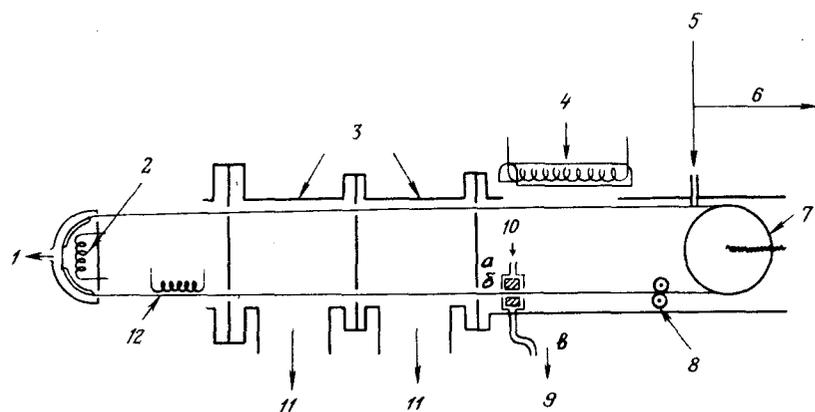


Рис. 5-10. Сопряжение жидкостного хроматографа с масс-спектрометром при помощи движущей ленты (с разрешения Finigan Corporation).

a - ввод растворителя для очистки ленты, *b* - удаление неорганического осадка, *в* - слив; 1 - источник ионов, 2 - испаритель, 3 - вакуумноплотные сальники, 4 - источник ИК-излучения, 5 - ввод элюата из хроматографической колонки, 6 - расщепление потока, 7 - приводные ролики, 8 - движущие ролики, 9 - слив, 10 - промывной растворитель, 11 - насосы, 12 - нагреватель очистительного устройства.

В последнее время в ВЭЖХ-МС получила распространение также тенденция сочетать метод переноса на движущей ленте с методами, включающими ионизацию на поверхности, например масс-спектрометрию вторичных ионов (МСВИ) [22, 23], бомбардировку быстрыми атомами (ББА) [24] и лазерную десорбцию [25]. При применении этих методов упомянутые выше ограничения метода движущей ленты, связанные с возможностью термического разложения определяемых соединений в процессе удаления растворителя, могут быть почти полностью устранены.

5.2.3. Ввод пробы в масс-спектрометр через диафрагму с малым отверстием или через длинный капилляр

Системы, в которых ввод пробы осуществляется через диафрагму с малым отверстием, первоначально предназначались для соединения обычных колонок для ВЭЖХ с масс-спектрометром. Небольшая часть (около 1%) выходящего из колонки элюата подавалась в ионный источник масс-спектрометра, где пары растворителя выполняли роль газообразного реагента, обеспечивающего химическую ионизацию. В работах [26, 27]

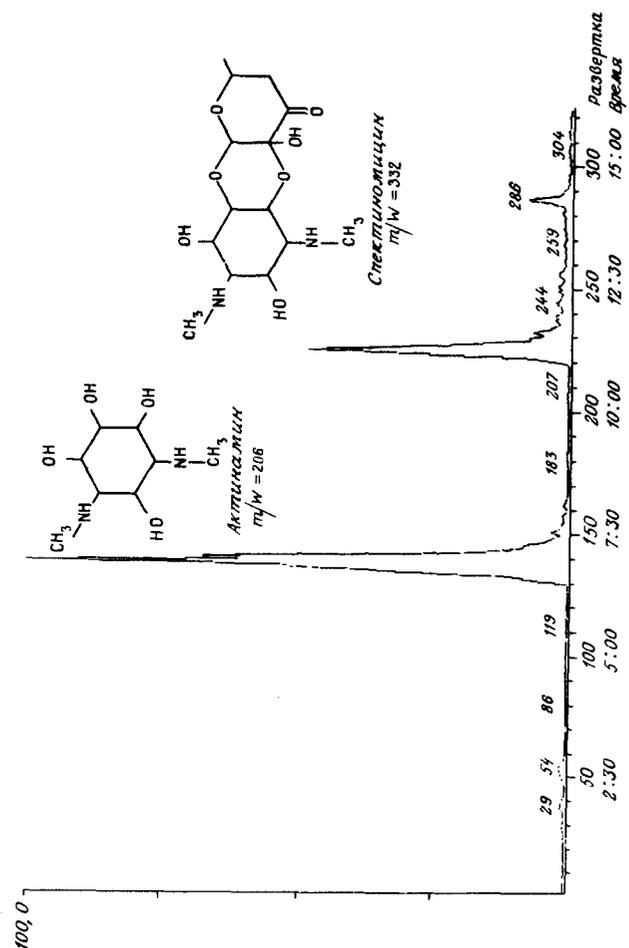


Рис. 5-11. Масс-спектрограмма, снятая по ионным токам, специфичным для актиномина и спектиномицина [19].

описаны системы (рис. 5-12), в которых весь элюат, выходящий из микроколоники для ВЭЖХ (10 - 60 мкл/мин), вводится в источник химической ионизации через диафрагму с отверстием диаметром 5 мкм. В такой системе летучие буферные смеси, содержащие гидроксид аммония, триметиламин, ацетат аммония и трифторуксусную кислоту, могут использоваться без каких-либо осложнений. С помощью этой системы был успешно проведен анализ различных стероидов.

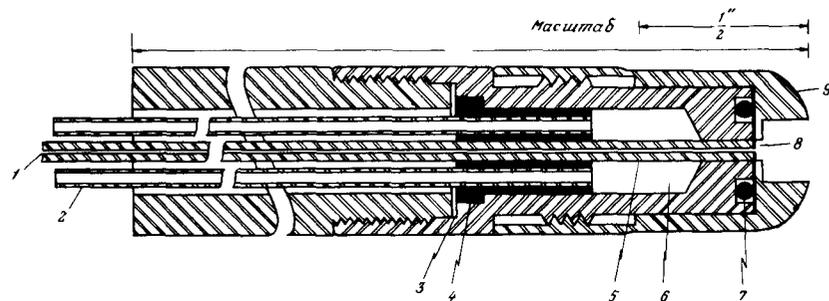


Рис. 5-12. Схема устройства для непосредственного сопряжения жидкостной хроматографической колонки с масс-спектрометром посредством диафрагмы с малым отверстием [26].

1 - элюат, выходящий из микроколоники для ВЭЖХ; 2 - ввод охлаждающей воды; 3 - фторопластовое уплотнение; 4 - выводная трубка; 5 - трубка из нержавеющей стали внутренним диаметром 0,004 дюйма (0,01 мм) и наружным диаметром 0,062 дюйма (0,16 мм); 6 - камера с охлаждающей водой; 7 - уплотнительное резиновое кольцо; 8 - съемный наконечник.

Бруинс и сотр. [28] предложили соединять микроколонику для ВЭЖХ с масс-спектрометром посредством длинного капилляра. Схема такого соединения изображена на рис. 5-13. Весь поступающий из микроколоники элюат (около 10 мкл/мин) вводится в масс-спектрометр с химической ионизацией через капилляр из кварцевого стекла (50 мкм (внутр. диам.) x 70 см), заключенный в медный блок, который нагревается от стенки ионизационной камеры. На рис. 5-14 показаны хроматограммы четырех сходных компонентов лекарственных средств, полученные с применением в качестве детекторов УФ-спектрометра и масс-спектрометра. Разделение проводилось в режиме обращенно-фазовой хроматографии при объемной скорости 8 мкл/мин. Как при диафрагменной, так и при капиллярной системе подключения колонки к масс-спектрометру возможны неполадки, связанные с отклонением оси сопла от прямой линии при откачке системы [28]. Обычно такое отклонение обусловлено неправильной формой отверстия и чаще на-

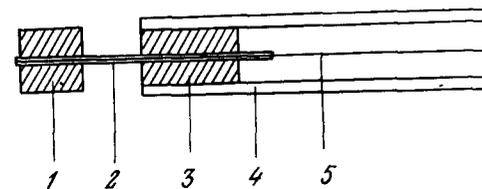


Рис. 5-13. Схема непосредственного сопряжения хроматографической колонки с масс-спектрометром посредством длинного капилляра [28].

1 - медный блок (наружн. диам. 4,9 мм); 2 - трубка из нержавеющей стали (внутр. диам. 0,25 мм, наружн. диам. 0,5 мм); 3 - фторопластовый изолятор; 4 - трубка из нержавеющей стали (внутр. диам. 4,6 мм, наружн. диам. 6,4 мм); 5 - капилляр из кварцевого стекла (внутр. диам. 0,050 мм, длина 70 см).

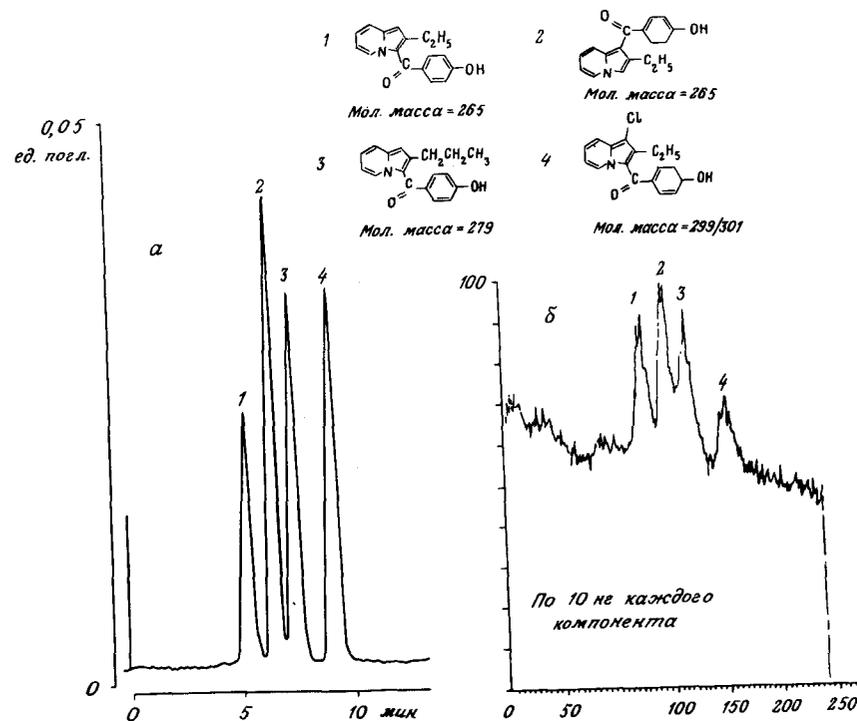


Рис. 5-14. Хроматограммы смеси четырех компонентов лекарственных препаратов [28]: а - полученная с УФ-детектором при длине волны 390 нм; б - масс-спектрограмма, полученная путем регистрации суммарного ионного тока ($m/z = 150-350$). Подвижная фаза ацетонитрил/вода (70/30); объемная скорость 8 мкл/мин.

блюдается при использовании диафрагмы с малым (1-10 мкм) отверстием. В результате неправильной формы отверстия при откачке системы через отверстие может происходить интенсивное распыление жидкости. В связи с этим для длительной стабильной работы состояние отверстия или капилляра необходимо тщательно контролировать.

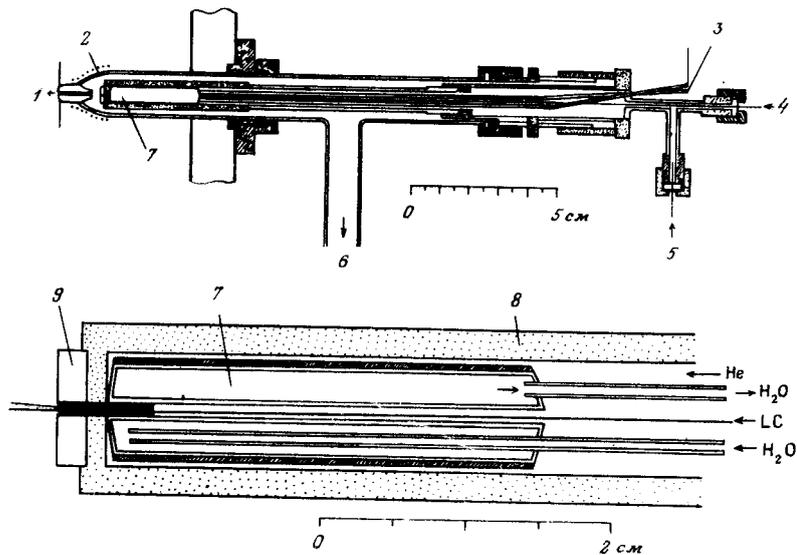


Рис. 5-15. Схема сопряжения жидкостной хроматографической колонки с масс-спектрометром посредством вакуумного распылителя [29].

1 - нагреватель; 2 - охлаждающая вода; 3 - кожух; 4 - масс-спектрометр; 5 - жидкостной хроматограф; 6 - распыляющий газ (гелий); 7 - кожух из мафора (стеклокерамика); 8 - медный диск.

5.2.4. Ввод через вакуумный распылитель с обогащением

На рис. 5-15 показаны схема соединения колонки с масс-спектрометром с помощью распылителя и часть распылительного наконечника (с увеличением) [29]. Кожух с водяным охлаждением изготовлен из стеклокерамики фирмы Masog, отличающейся низкой теплопроводностью. В последней конструкции этой системы (рис. 5-16) весь элюат из микроколонки (10 - 50 мкл/мин) подается в верхнюю часть распылительного наконечника (внутренний диаметр 12 мкм), изготовленного из кварцевого стекла, и распыляется потоком выходящего из сопла газа, поступающего через зазор между наконечником и

наружным кожухом из нержавеющей стали (внутренний диаметр 0,33 мм, наружный диаметр 0,63 мм). После удаления большей части паров растворителя форвакуумным насосом обогащенные компоненты непрерывно поступают в химический ионный источник квадрупольного масс-спектрометра. При использовании распыляющего газа жидкость распыляется лучше, и благодаря этому фрагментация молекул анализируемых веществ происходит достаточно стабильно (рис. 5-16). Стабильность работы прибора при применении такого принудительного распыления также значительно улучшается. С помощью описанной системы ВЭЖХ-МС удалось успешно определять многие малолетучие и/или термолабильные вещества, в том числе аминокислоты, пептиды, сахараиды [29], пестициды, стероиды [30] и свободные жирные кислоты [31].

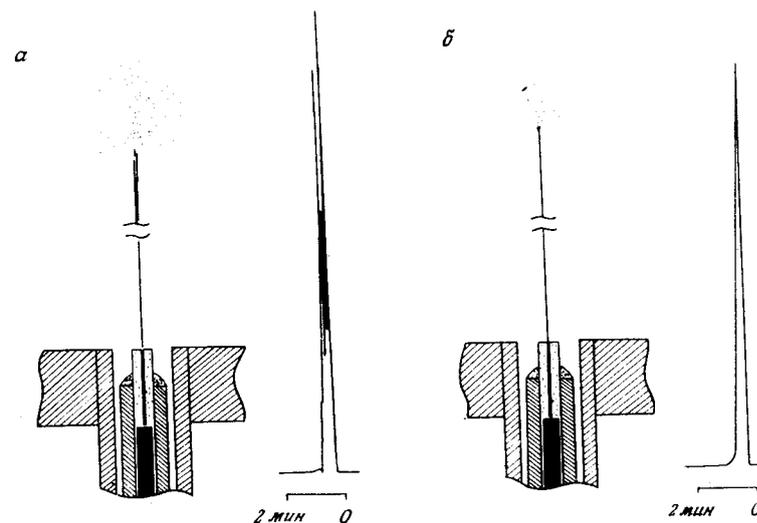


Рис. 5-16. Действие распыляющего газа [17]: а - ввод пробы без распыляющего газа; б - с распыляющим газом (гелием). Проба аминопирин. Масс-хроматограмма получена путем селективного мониторинга иона.

На рис. 5-17 приведены типичные хроматограммы свободных жирных кислот бобового масла. Разделение проводили на насадочной микроколонке при объемной скорости 16 мкл/мин, определяемые компоненты детектировались УФ-детектором при длине волны 210 нм и квадрупольным масс-спектрометром с химической ионизацией в режиме многоканального детектиро-

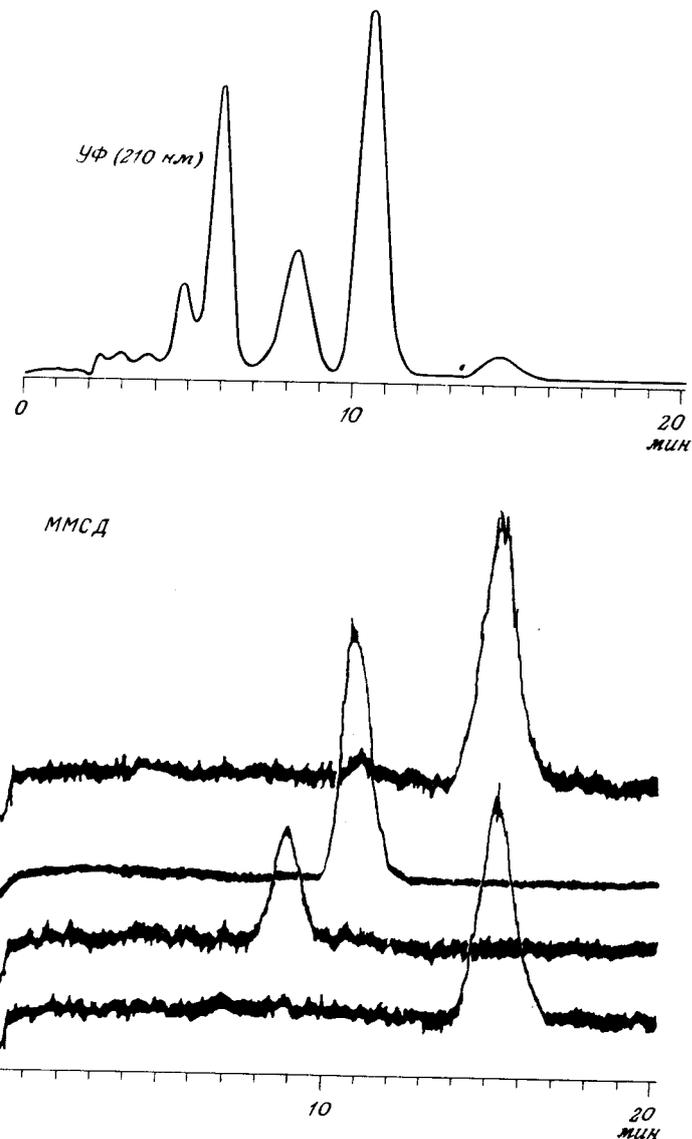


Рис. 5-17. Хроматограммы смеси свободных жирных кислот, содержащихся в соевом масле, полученные при применении УФ-детектора и многоканального масс-спектрометрического детектирования [31]. Колонка 145 мм x 0,5 мм (внутр. диам.); неподвижная фаза силикагель, модифицированный ОДС (10 мкм); подвижная фаза метанол/вода (9:1); объемная скорость 16 мкл/мин; УФ-детектор работал при длине волны 210 нм.

вания (МКД). В этом режиме взаимно перекрывающиеся пики олеиновой и пальмитиновой кислот успешно детектируются масс-спектрометром раздельно на разных каналах.

Чтобы добиться достаточно стабильной работы систем ВЭЖХ-МС, основанных на вводе элюата в масс-спектрометр через распылитель, необходимо обратить особое внимание на очистку элюата от твердых частиц. Для этого обычно используют подходящие фильтры. Важное значение имеет также форма температурного поля вокруг наконечника распылителя.

5.2.5. Термораспыление

Термораспыление - это полное или частичное испарение потока жидкости, иногда сопровождающееся ионизацией, происходящее при распылении ее из капиллярного сопла с одновременным нагревом. Системы для термораспыления первоначально снабжались лазерным нагревателем, затем в этих же целях использовались кислородно-водородные горелки, а в последнее время - электрические нагреватели. Схема современного термораспылительного устройства дана на рис. 5-18 [32].

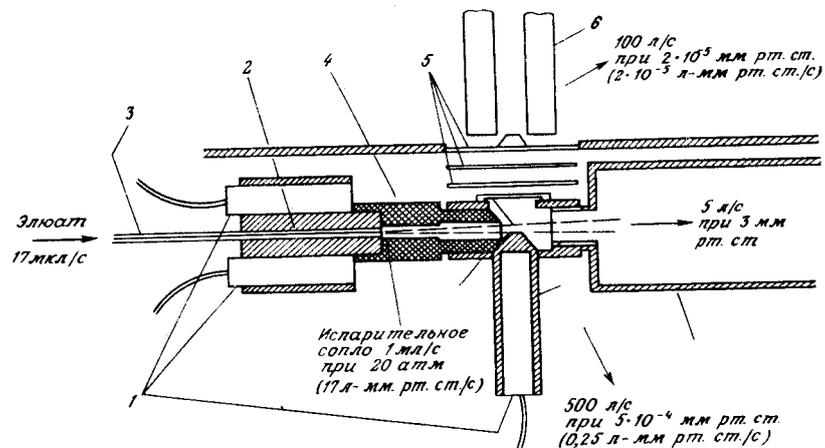


Рис. 5-18. Схема сопряжения жидкостной хроматографической колонки с масс-спектрометром посредством термораспылителя [32].

1 - цилиндрический нагреватель (100 Вт); 2 - медный блок, напаянный на капилляр из нержавеющей стали; 3 - капилляр из нержавеющей стали, внутр. диам. 0,15 мм, наружн. диам. 1,5 мм; 4 - толстостенная медная трубка; 5 - ионные линзы; 6 - квадрупольный массовый фильтр; 7 - линия, ведущая к форвакуумному насосу; 8 - отверстие для вывода ионов; 9 - нагреватель источника.

Элюат из колонки для ВЭЖХ (при объемной скорости водной подвижной фазы до 2 мл/мин) распыляется непосредственно в ионном источнике. Избыточные пары откачиваются через отверстие, расположенное напротив распылительного сопла, представляющего собой капилляр из нержавеющей стали с внутренним диаметром 0,15 мм и внешним диаметром 1,5 мм. Часть образующихся ионов вводится в квадрупольный масс-спектрометр через специальное напускное отверстие. При использовании подвижной фазы, содержащей растворенные ионы в значительных концентрациях (примерно от 10^{-4} до 1 моль/л), внешнего источника ионизации не требуется.

На рис. 5-19 приведена хроматограмма смеси пептидов, полученная с применением термораспылительной системы для их определения. Гексапептид, содержащий аргинин, и пептид, содержащий орнитин, разделялись на короткой колонке, на-

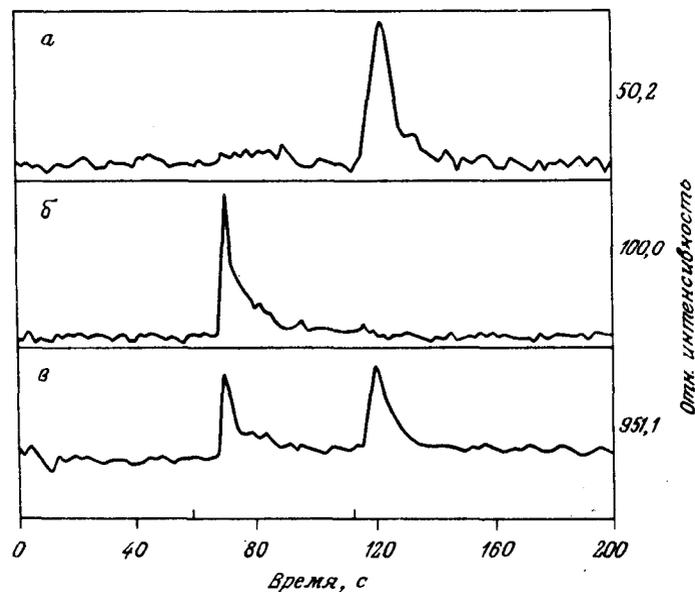


Рис. 5-19. Масс-хроматограммы пептидов [33]. Колонка 50 мм x 4,1 мм (внутр. диам.); неподвижная фаза силикагель, модифицированный ОДС (3 мкм); подвижная фаза ацетонитрил/0,1 моль/л водный раствор ацетата аммония; элюирование градиентное (концентрация ацетонитрила меняется в процессе разделения от 30 до 50%).

а - орнитиновый белок (Thr-Thr-Vin-Gln-Orn-Trp-NH₂, мол. масса 738; $m/z = 368-372$); б - аргининовый белок (Thr-Thr-Arg-Gln-Arg-Tyr-NH₂, мол. масса 822, $m/z = 409-413$); в - реконструированная суммарная хроматограмма.

полненной силикагелем с частицами размером 3 мкм, модифицированным ОДС. Оба пептида детектировались в виде двузарядных положительных ионов.

Описано также прямое определение глюкуронидов [33] и пестицидов [34]. Хотя этот метод еще не вполне разработан, он начинает получать распространение в качестве перспективного способа сопряжения ВЭЖХ-МС. Термораспыление до последнего времени применялось исключительно при работе с квадрупольными масс-спектрометрами. Однако в одной из последних статей [35] описано применение этого метода для прямого соединения жидкостного хроматографа с магнитным масс-спектрометром, ионный источник которого работал при высоком (до 4 кВ) напряжении. Элюат из хроматографической колонки вводился в испаритель термораспылителя через кварцевый капилляр длиной 120 см с внутренним диаметром 150 мкм. Таким образом жидкостной хроматограф изолировался от высокого напряжения. Описанная конструкция позволяет расширить возможности системы ВЭЖХ-МС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jinno K., Fujimoto C., Uematsu G. Amer. Lab., 1984, 16(2), 39.
2. Fujimoto C., Uematsu G., Jinno K. Chromatographia, 1985, 20, 112.
3. Fujimoto C., Jinno K. J. High Resolut. Chromatogr./Chromatogr. Commun., 1983, 6, 374.
4. Kuehl D., Griffiths P.R. J. Chromatogr. Sci., 1979, 17, 471.
5. Kuehl D.T., Griffiths P.R. Anal. Chem., 1980, 52, 1394.
6. Jinno K., Fujimoto C., Hirata Y. Appl. Spectrosc., 1982, 36, 67.
7. Jinno K., Fujimoto C., Ishii D. J. Chromatogr., 1982, 230, 625.
8. Fujimoto C., Jinno K., Hirata Y. J. Chromatogr., 1982, 258, 81.
9. McFadden W.H. Chromatogr. Sci., 1980, 18, 97.
10. Tsuge S. Kagaku no Ryoiki Zokan, 1981, 132, 132-170.
11. Curry Z.F. Liq. Chromatogr., 1982, 5, 257.
12. Arpino P.J. Trends in Anal. Chem., 1982, 1, 154.
13. McFadden W.H. Anal. Proc., 1982, 19, 258.
14. Games D.E. Anal. Proc., 1982, 20, 352.
15. Desiderio D.M., Fridland G.H., Stout C.B. J. Liq. Chromatogr., 1984, 7, 317.
16. Games D.E., Alcock N.J., McDonall M.A.A. Anal. Proc., 1984, 21, 24.
17. Tsuge S. in Microcolumn Separation, Novotny M.V., Ishii D., Eds., 1985, pp. 217-241.
18. Henion J. in Microcolumn Separation, Novotny M.V., Ishii D., Eds., 1985, pp. 243-274.
19. Kelly P.E. Finigan Application Report no. AR8006, 1980.

20. Hayes M.J., Lankmayer E.P., Vouros P., Karger B.L., McGuire J.M. Anal. Chem., 1983, 55, 1745.
21. Karger B.L., Kirby D.P., Vouros P., Foltz R.L., Hidy B. Anal. Chem., 1979, 51, 2324.
22. Benninghoven A., Eicke A., Junack M., Sichtermann W., Kirzek J., Peters H. Org. Mass Spectrom., 1980, 15, 457.
23. Smith H.D., Burger J.E., Johnson A.L. Anal. Chem., 1981, 53, 1603.
24. Hunt D.F., Bone W.M., Shabanowitz J., Rhodes J., Ballard J.M. Anal. Chem., 1981, 53, 1704.
25. Hardin E.D., Vestal M.L. Anal. Chem., 1981, 53, 1492.
26. Henion J., Wachs T. Anal. Chem., 1981, 53, 1936.
27. Eckers C.E., Skrabalak O.S., Henion J.D. Clin. Chem., 1982, 28, 1882.
28. Bruins A.P., Drenth B.F.H. J. Chromatogr., 1983, 271, 71.
29. Yoshida Y., Yoshida H., Truge S., Takeuchi T., Mochizuki K. J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun., 1980, 3, 16.
30. Yoshida H., Matsumoto K., Itoh K., Tsuge S., Hirata Y., Mochizuki K., Kokubun N., Yoshida Y. Fresenius Z. Anal. Chem., 1982, 311, 674.
31. Matsumoto K., Yoshida H., Ohta K., Tsuge S. Org. Spectrom., 1985, 20, 777.
32. Blakley C.R., Vestal M.L. Anal. Chem., 1983, 55, 750.
33. Pilosof D., Kim H.Y., Dyckes D.F., Vestal M.L. Anal. Chem., 1984, 56, 1236.
34. Voyksner R.D., Bursey J.T., Pellizzar E.D. Anal. Chem., 1984, 56, 1507.
35. Vestal M.L. Anal. Chem., 1984, 56, 2590.

6. ПОЛУЧЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ПОСЛЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО РАЗДЕЛЕНИЯ

М. Сенда, С. Хигасидате*

6.1. ВВЕДЕНИЕ

В анализе методом ВЭЖХ для детектирования соединений, не поглощающих в УФ- или видимой области спектра и неспособных флуоресцировать, их часто переводят в подходящие производные либо до, либо после хроматографического разделения. В ряде случаев дериватизацию проводят с целью повышения селективности или чувствительности определения. Если производные получают перед разделением, то соответствующую реакцию проводят до ввода пробы в колонку. В этом случае всю процедуру можно рассматривать как метод предварительной подготовки пробы. При этом не имеет никакого значения, используется ли затем для разделения обычная ВЭЖХ или микро-ВЭЖХ.

При послеколоночной дериватизации выходящий из колонки элюат, содержащий разделенные компоненты пробы, смешивается с необходимым реагентом и вводится в реактор, в котором и происходит образование необходимых производных. Продукты этой реакции далее детектируются с помощью фотометрического, флуориметрического или электрохимического детектора. Для проведения реакции применяются реакторы трех типов: в виде полый трубки, в виде трубки с насадкой и в виде трубки с расчлененным потоком. Любой из этих реакторов неизбежно приводит к внеколоночному размыванию пиков, поскольку перемещение определяемых компонентов в реакторе происходит достаточно медленно.

Таким образом, внеколоночное размывание пиков, обусловленное включением в систему микроколоночной ВЭЖХ реактора с целью дериватизации разделенных компонентов, устранить чрезвычайно трудно. Дильдер и сотр. [1-3] подробно исследовали внеколоночное размывание пиков, вызываемое реакторами всех перечисленных выше типов в обычной ВЭЖХ. В настоящей главе полученные этими авторами результаты будут использованы применительно к внеколоночному размыванию пика в микро-ВЭЖХ для реакторов двух типов - полого труб-

*M.Senda, S.Higashidate, Japan Spectroscopic Company, Ltd., Hacioji City, Tokyo 192, Japan.

чатого и трубчатого с насадкой. В нижеследующем рассмотрении фигурируют преимущественно полумикроколонки, объем которых примерно в десять раз меньше объема обычных колонок для ВЭЖХ. Реакторы, которые можно сочетать с колонками объемом в одну сотую и меньше объема обычных колонок, здесь не рассматриваются. Конструирование таких реакторов представляет собой чрезвычайно трудную задачу.

6.2. РАЗМЫВАНИЕ ПИКА, ОБУСЛОВЛЕННОЕ РЕАКТОРАМИ

6.2.1. Полые трубчатые реакторы

Временная вариация наблюдаемого пика $\sigma_{t(\text{об})}^2$ выражается как сумма вкладов в вариацию пика колонки $\sigma_{\text{тс}}^2$ и трубчатого реактора $\sigma_{\text{тр}}^2$:

$$\sigma_{t(\text{об})}^2 = \sigma_{\text{тс}}^2 + \sigma_{\text{тр}}^2 \quad (1)$$

Величина $\sigma_{\text{тр}}^2$ вычисляется по формуле

$$\sigma_{\text{тр}}^2 = \kappa \frac{d_i^2 t}{96 D_m} \quad (2)$$

где d_i - внутренний диаметр реактора, D_m - коэффициент диффузии молекул компонента в заполняющей реактор жидкости, t - среднее время пребывания молекулы компонента в реакторе. Параметр κ связан со спиральной формой реактора и выражается посредством чисел Дина (Dn) и Шмита (Sc). Если $12,5 > (Dn \times Sc^{0,5}) < 250$, то κ определяется следующим выражением

$$\kappa = 5,6(Dn \times Sc^{0,5})^{-0,67} \quad (3)$$

Числа Dn и Sc вычисляются по формулам

$$Dn = \frac{4F\rho}{\pi\eta d_i} (d_i/d_c)^{0,5} \quad (4)$$

$$Sc = \frac{\eta}{\rho D_m} \quad (5)$$

где F - суммарная объемная скорость подвижной фазы и раствора реагента, ρ - плотность жидкости в реакторе, η - ее вязкость, d - диаметр спирали. Перепад давления приближенно выражается следующим образом:

$$\Delta P = \frac{512 \eta F^2 t}{\pi^2 d_i^6} \quad (6)$$

а среднее время нахождения молекулы в реакторе составляет

$$t = \frac{\pi d_i^2 L}{4F} \quad (7)$$

где L - длина реакторной спирали. Подставим в уравнения (2) - (7) значения d_i и F , обычные для внутреннего диаметра колонки и объемной скорости в полумикро-ВЭЖХ: $d_i = 0,1$ мм, $F = 3,333 \cdot 10^{-3}$ см³/с. Приняв $D_m = 10^{-5}$ см²/с, $\rho = 1$ г/см³, $\eta = 10^{-2}$ г/см·с и $d_c = 2$ см, получаем

$$t = 0,02355 L \quad (8)$$

$$\sigma_{\text{тр}}^2 = 0,02762 t \quad (9)$$

$$\Delta P = 5,770 \cdot 10^6 t \quad (10)$$

Если принять $d_i = 0,25$ мм, то

$$t = 0,1472 L \quad (11)$$

$$\sigma_{\text{тр}}^2 = 0,2346 t \quad (12)$$

$$\Delta P = 0,02363 \cdot 10^6 t \quad (13)$$

Если мы применим полумикроколонку, описанную в табл. 2-1 (250 мм x 1,5 мм (внутр. диам.), 10 000 теор. тарелок), то при скорости подвижной фазы 0,1 мл/мин ($1,667 \cdot 10^{-3}$ см³/с) объем пика компонента с $k' = 1$ равен 24 мкл, а $\sigma_{\text{тс}}$ для этого пика равна 3,72 с. Если допустимое размывание пика, обусловленное вкладом реактора, не должно превышать 10%, т. е. $\sigma_{t(\text{об})}/\sigma_{\text{тс}} < 1,1$, то вычисление максимального вклада реактора в вариацию времени по уравнению (1) дает

$$\sigma_{\text{тр}(\text{max})}^2 = 2,91 \text{ с}^2 \quad (14)$$

Если вклад реактора в перепад давления при объемной скорости реагента $1,667 \cdot 10^{-3}$ см³/с (и суммарной объемной скорости $3,333 \cdot 10^{-3}$ см³/с) составляет менее 100 бар

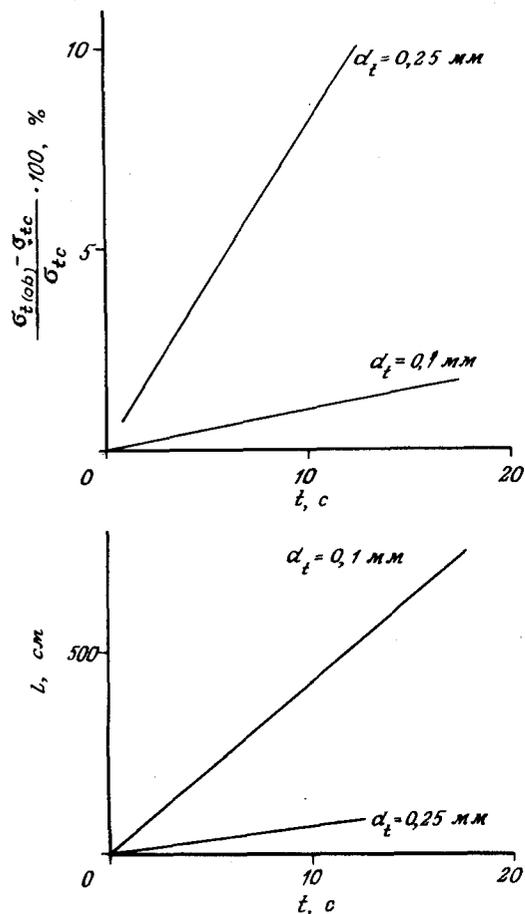


Рис. 6-1. Взаимосвязь между продолжительностью реакции t , длиной реактора L и размытием пика. $\sigma_{t(ob)}$ - стандартное отклонение наблюдаемого пика, выраженное в единицах времени; σ_{tc} - вклад колонки в стандартное отклонение пика; d_t - внутренний диаметр трубки реактора.

($100 \cdot 10^6$ г/см.с²), максимальную продолжительность реакции t_{max} и максимальную длину реактора L_{max} можно вычислить (например, для реакторов с внутренним диаметром 0,1 или 0,25 мм) с помощью уравнений (8) - (14) (табл. 6-1).

Как следует из рис. 6-1, зависимость между продолжительностью реакции, длиной реактора и вкладом реактора в размытие пика при $\sigma_{t(ob)}/\sigma_{tc} < 1,1$ и $\Delta P < 100$ бар можно найти с помощью уравнений (1), (8) - (14).

Таблица 6-1. Максимальная продолжительность реакции и максимальная длина реактора для полых трубчатых реакторов^a

Внутр. diam. реактора, мм	t_{max} , с	L_{max} , см
0,1	17,3	740
0,25	12,4	80

^a Допустимо уширение пика на 10% и падение давления на 100 бар.

6.2.2. Насадочные реакторы

Насадочные реакторы обычно представляют собой трубку из нержавеющей стали, заполненную непористыми сферическими бусами из стекла. Приведенную высоту, эквивалентную теоретической тарелке, h для насадочного реактора можно вычислить по формуле

$$h = \frac{2\gamma}{\nu} + A\nu^{0.33} \quad (15)$$

где ν - приведенная скорость жидкости в реакторе, γ - коэффициент извилистости реактора, A - константа, зависящая от геометрии насадки. Для хорошего насадочного реактора γ и A равны 0,8 [3], а ν определяется выражением

$$\nu = \frac{ud_p}{D_m} \quad (16)$$

где d_p - диаметр частиц, D_m - коэффициент диффузии молекул определяемого компонента в жидкости, заполняющей реактор, u - линейная скорость в реакторе:

$$u = \frac{L}{t} \quad (17)$$

где L - длина реактора, t - среднее время нахождения молекулы компонента в реакторе. Число теоретических тарелок N выражается формулой:

$$N = \frac{L}{H} = \frac{L}{hd_p} \left(\frac{t}{\sigma_{tr}} \right)^2 \quad (18)$$

где H - высота, эквивалентная теоретической тарелке, для реакционной колонки, σ_{tr}^2 - вклад реактора в вариацию времени пика. Используя уравнения (15) - (18), получаем

$$\sigma_{tr}^2 = \frac{2\gamma D_M t^3}{L^2} + \frac{A t^{1,66} d_p^{1,33}}{L^{0,67} D_M^{0,33}} \quad (19)$$

Перепад давления в реакторе определяется следующим образом:

$$\Delta P = \frac{\eta L^2}{k_0 d_p^2} \quad (20)$$

где k_0 - константа проницаемости насадки реактора.

Среднее время нахождения компонента в реакторе t

$$t = \frac{\epsilon \pi d_c^2 L}{4F} \quad (21)$$

где d_c - внутренний диаметр трубки реактора, F - суммарная объемная скорость смеси реагента и подвижной фазы, ϵ - коэффициент пористости насадки. Подставим в уравнения (19) - (21) типичные для полумикро-ВЭЖХ значения $d_c = 1,5$ мм, $F = 3,333 \cdot 10^{-3}$ см³/с и примем, что $\epsilon = 0,48$, $A = 0,8$, $D_M = 10^{-5}$ см²/с, $\eta = 10^{-2}$ г/см.с² и $k_0 = 2 \cdot 10^{-3}$. Тогда

$$t = 2,543 L \quad (22)$$

$$\sigma_{tr}^2 = (2,631 \cdot 10^{-4} + 168,3 d_p^{1,33}) L \quad (23)$$

$$\Delta P = 1,996 L / d_p^2 \quad (24)$$

Таблица 6-2. Максимальная продолжительность реакции и максимальная длина реактора для насадочных реакторов^a

Размер частиц насадки, мкм	t_{\max} , с	L_{\max} , см
10	129	51
20	168	66
30	98	39
40	67	26
50	50	20

^a Допустимо уширение пика на 10% и падение давления на 100 бар. Внутр. диам. реактора 1,5 мм.

Для одной и той же разделительной колонки при тех же допущениях для величин $\sigma_{t(ob)}/\sigma_{tc}$ и ΔP , что и для открытых безнасадочных капиллярных реакторов (см. табл. 6-2) и $k' = 1$ максимальную продолжительность реакции (t_{\max}) и максимальную длину реактора (L_{\max}) можно вычислить для насадок с разными размерами частиц с помощью уравнений (14), (22) - (24). Как показано на рис. 6-2, взаимосвязь между продолжительностью реакции, длиной реактора и вкладом реактора в расширение пика имеет тот же характер, что и для безнасадочного капиллярного реактора.

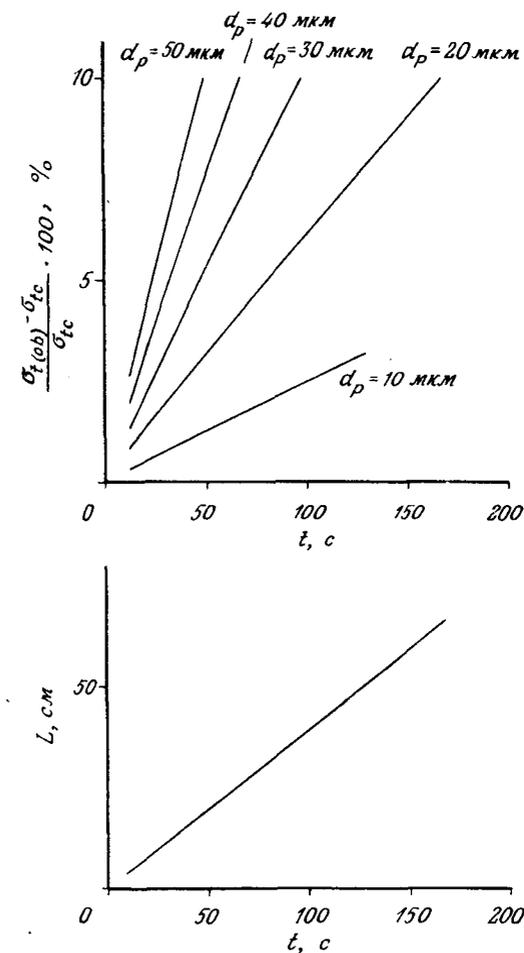


Рис. 6-2. Взаимосвязь между продолжительностью реакции t , длиной реакционной колонки L и размыванием пика. $\sigma_{t(ob)}$ - стандартное отклонение наблюдаемого пика, выраженное в единицах времени; σ_{tc} - вклад колонки в стандартное отклонение пика; d_p - диаметр частиц насадки.

Как уже указывалось выше, при применении полумикроколонки безнасадочные открытые капиллярные реакторы пригодны в тех случаях, если продолжительность реакции составляет от одной до десяти секунд; если же продолжительность реакции составляет от нескольких секунд до примерно одной сотой секунды, то целесообразнее использовать насадочные реакторы.

6.3. ПРИМЕНЕНИЕ

Йошиока и сотр. [4] разработали метод анализа адениновых нуклеотидов с применением системы микро-ВЭЖХ с послеколонным реактором. На рис. 6-3 показана блок-схема такого анализатора. Реагент (бромацетальдегид), необходимый для получения соответствующих производных нуклеотидов, вводится в элюент заранее. Поступающий из колонки элюат, содержащий разделенные адениновые нуклеотиды, вводится вместе с реагентом в спиральный реактор, нагретый до 100°C. В результате протекающей в нем реакции образуются интенсивно флуоресцирующие соединения - 1-N⁶-этноадениновые (ϵ -адениновые) нуклеотиды (рис. 6-4). Продукты реакции непрерывно детектируются флуориметрическим детектором. Флуо-

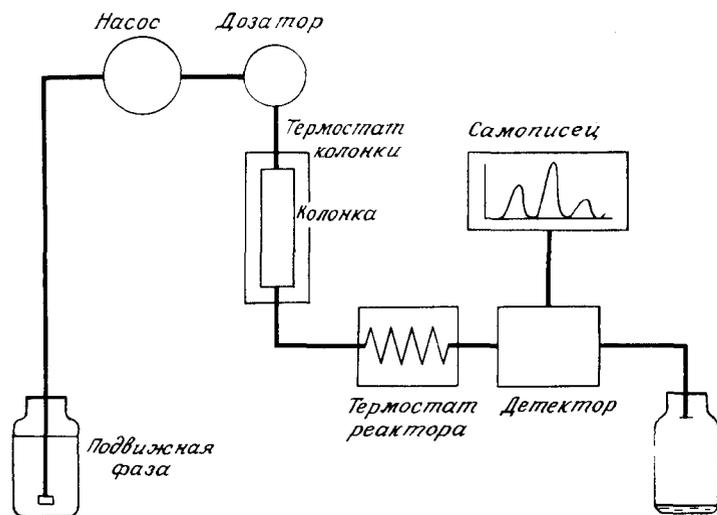


Рис. 6-3. Блок-схема анализатора адениновых нуклеотидов с применением послеколонной дериватизации разделенных компонентов.

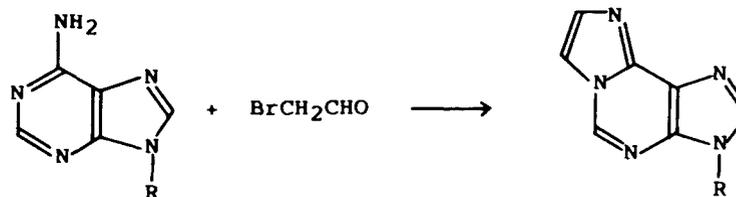


Рис. 6-4. Реакция бромацетальдегида с адениновыми нуклеотидами.

ресценцию возбуждает излучение с длиной волны 253,7 нм, а измерение проводится при 400 нм. На рис. 6-5 показана хроматограмма стандартной смеси аденозина, аденозинмонофосфата (АМФ), аденозиндифосфата (АДФ) и аденозинтрифосфата (АТФ), а на рис. 6-6 - хроматограмма адениновых нуклеотидов, выделенных из мозга крысы.

Такеучи и сотр. [5] применили описанный метод для анализа желчных кислот. В качестве послеколонного реактора использовалась колонка с иммобилизованным ферментом [6]. Этот же подход можно применять для определения методом

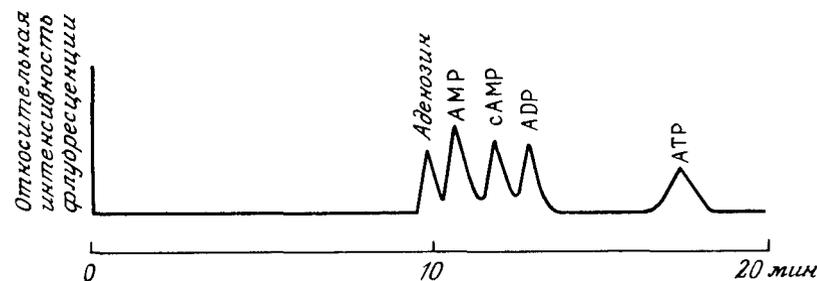


Рис. 6-5. Хроматограмма стандартной смеси аденозиновых и адениновых нуклеотидов. Детектировались продукты послеколонной реакции разделенных компонентов с бромацетальдегидом. Колонка 35 мм x 4,6 мм (внутр. диам.); неподвижная фаза Hitachi gel 3012-N (сферические частицы анионообменного пористого полистирольного полимера диаметром 7 мкм); температура колонки 45°C; подвижная фаза раствор, содержащий 0,025 моль/л лимонной кислоты, 0,05 моль/л гидрофосфата натрия и 0,4 моль/л хлорида натрия (рН 5,0)/ацетонитрил (4/1), содержащий 0,1 моль/л бромацетальдегида; объемная скорость 0,1 мл/мин; реакционная спиральная колонка 30 м x 0,1 мм (внутр. диам.); температура реакционной колонки 100°C; детектирование флуоресцентное, длина волны возбуждающего излучения 253,7 нм, измеряемого флуоресцентного излучения 400 нм. АМФ - аденозинмонофосфат, сАМФ - циклический АМФ, АДФ - аденозиндифосфат, АТФ - аденозинтрифосфат. Содержание каждого из компонентов в пробе 1 пмоль.

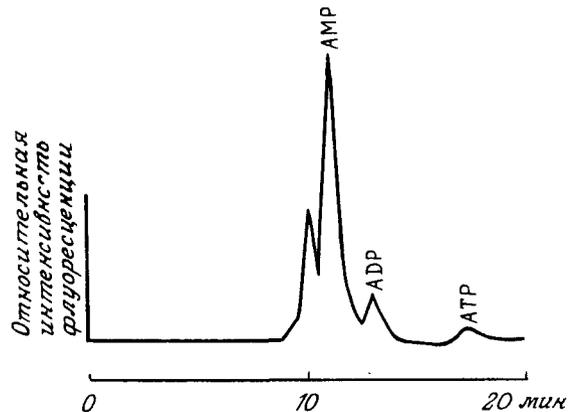


Рис. 6-6. Хроматограмма адениновых нуклеотидов, выделенных из мозга крысы. Условия те же, что и на рис. 6-5.

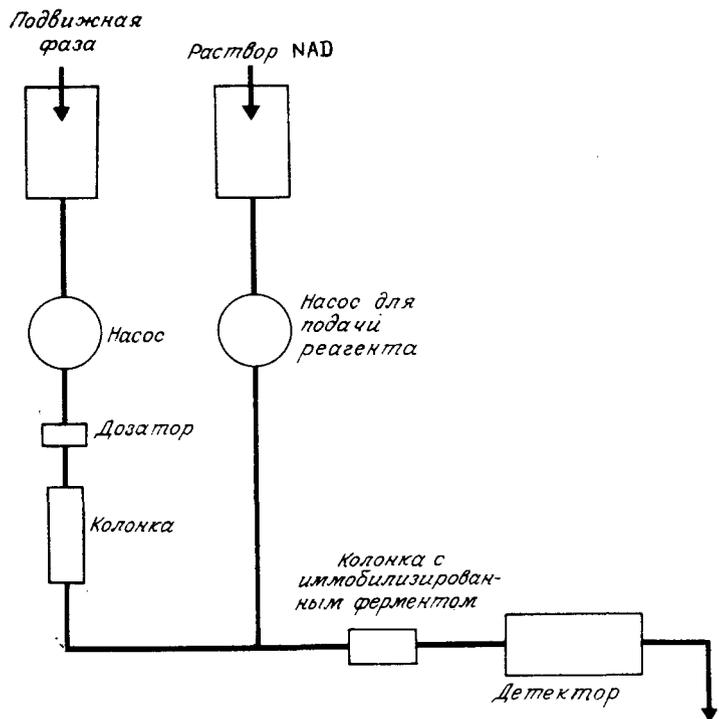


Рис. 6-7. Блок-схема аналитической установки для определения 3α - и 3β -оксистероидов с использованием послеклоночной ферментативной дериватизации разделенных компонентов.

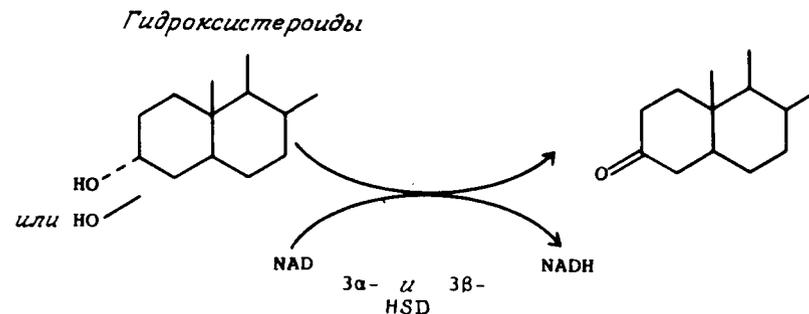
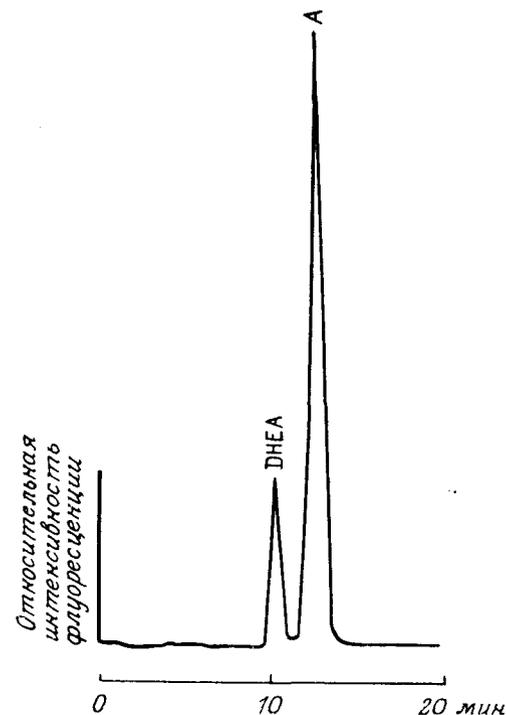


Рис. 6-8. Катализируемая ферментом реакция оксистероидов с NAD.

микро-ВЭЖХ 3α - и 3β -оксистероидов. На рис. 6-7 показана схема соответствующей аналитической установки. Выходящий из колонки элюат, содержащий разделенные оксистероиды, смешивается с раствором NAD, подаваемым специальным насо-

Рис. 6-9. Хроматограмма стандартной смеси андростерона и дегидроэпиандростерона с послеклоночной дериватизацией разделенных компонентов по ферментативной реакции с NAD. Колонка 250 мм x 1,5 мм (внутр. диам.); неподвижная фаза JASCO Fine SIL C₁-5; температура колонки 25°C; подвижная фаза метанол/вода (60/40); объемная скорость 0,1 мл/мин; колонка с иммобилизованным ферментом 30 мм x 1,5 мм (внутр. диам.); с μ S-Enzymerak-HSD; реагент 0,3 ммоль/л NAD + 10 ммоль/л фосфат K + 1 ммоль/л ЭДТА + 0,05% 2-меркаптоэтанола (pH 7,8); объемная скорость 0,1 мл/мин; температура 25°C; детектирование флуоресцентное, длина волны возбуждающего излучения 340 нм, измеряемого - 470 нм. Пики: А - андростерон (7,3 нг), ДНЕА - дегидроэпиандростерон (7,2 нг).



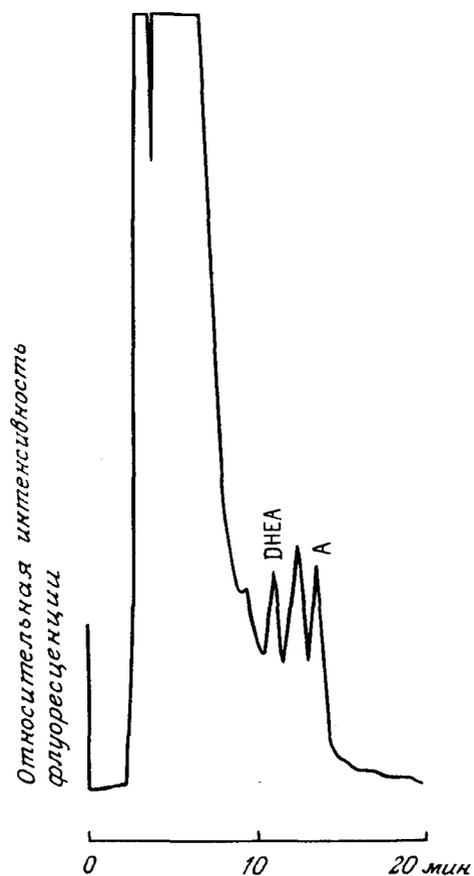


Рис. 6-10. Хроматограмма андростерона и дегидроэпиандростерона, содержащихся в моче здорового человека. Условия получения в подписи к рис. 6-9.

сом. Полученная смесь поступает в колонку с ферментом, где дегидрогеназы 3α - и 3β -оксистероидов иммобилизуются. В этой колонке оксистероиды окисляются, а NAD восстанавливается до NADH. Это последнее соединение обладает интенсивной флуоресценцией (см. рис. 6-8). Для определения оксистероидов достаточно возбуждать NADH излучением с длиной волны 340 нм и измерять интенсивность флуоресценции при 470 нм. На рис. 6-9 приведена хроматограмма стандартной смеси андростерона (3α -оксистероид) и дегидроэпиандростерона (3β -оксистероид), а на рис. 6-10 - хроматограмма андростерона и дегидроэпиандростерона, выделенных из мочи человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Deelder R.S., Kroll M.G.F., Van den Berg J.H.M. J. Chromatogr. 1986, 125, 307.
2. Deelder R.S., Kroll M.G.F., Beeren A.J.B., Van den Berg J.H.M. J. Chromatogr. 1978, 149, 669.
3. Deelder R.S., Kuijpers A.T.J.M., Van den Berg J.H.M. J. Chromatogr. 1983, 255, 545.
4. Yoshioka M., Tamura Z., Senda M., Miyazaki T. J. Chromatogr. 1985, 344, 345.
5. Takeuchi T., Saito S., Ishii D. J. Chromatogr. 1983, 258, 125.
6. Okuyama S., Kokubun N., Higashidate S., Uemura D, Hirata Y. Chem. Lett. 1979, 12, 1443.

7. ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОМАСШТАБНОЙ ВЭЖХ

Д. Исии, Т. Такеучи, К. Хиби*

7.1. ВВЕДЕНИЕ

По сравнению с обычной ВЭЖХ, в которой применяются колонки диаметром 4 - 8 мм, микромасштабная ВЭЖХ обладает следующими преимуществами:

1. Невысокие эксплуатационные расходы благодаря малому потреблению растворителя.
2. Высокая чувствительность, обусловленная малой дисперсией хроматографической полосы в колонке.
3. Высокая эффективность длинных микроколонок.
4. Возможность использования ряда новых методов детектирования вследствие меньшей объемной скорости элюента.

Благодаря этим преимуществам микро-ВЭЖХ получила широкое распространение, и на ее основе разработано множество аналитических методик. В предыдущих главах рассмотрены некоторые из них. Еще несколько интересных примеров применения микро-, полумикро- и высокоскоростной ВЭЖХ описаны в настоящей главе.

7.2. ПРИМЕНЕНИЕ МИКРО-ВЭЖХ

7.2.1. Фундаментальные исследования

Одним из преимуществ микро-ВЭЖХ на колонках из политетрафторэтилена (ПТФЭ) является малое время их кондиционирования. Эта особенность таких колонок используется при исследовании свойств насадочных материалов и оптимизации условий анализа. Хара и сотр. [1] применили данный метод в исследованиях, посвященных оптимизации состава элюента при разделении индольных алкалоидов методом нормальной-фазовой ВЭЖХ на силикагеле.

Изучая свойства полистирольного геля с целью выбора наиболее приемлемого материала для разделения полимиксино-

*D Ishii, T. Takeuchi, Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya 464, Japan. K. Hibi, Japan Spectroscopic Company, Ltd., Hachioji City, Tokyo 192, Japan.

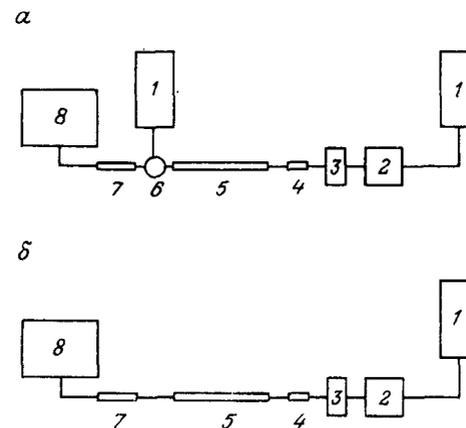


Рис. 7-1. Блок-схема системы микро-ВЭЖХ, предназначенной для определения желчных кислот.

а - послеколоночная смесительная система; б - предварительная смесительная система. 1 - насос, 2 - устройство для создания градиента, 3 - миниатюрный кран-дозатор, 4 - предохранительная колонка, 5 - разделительная колонка, 6 - тройник, 7 - колонка с иммобилизованным ферментом, 8 - флуориметр.

вых антибиотиков, Кимура и сотр. [2] также остановились на микро-ВЭЖХ. Мияки и сотр. [3] использовали фторопластовую микроколонку внутренним диаметром 0,5 мм для установления коэффициентов распределения ряда лекарственных средств между *n*-октанолом и водой. Неподвижной фазой служил силикагель, модифицированный октанолом. Это исследование должно было объяснить гидрофобность некоторых лекарственных средств.

7.2.2. Определение желчных кислот в сыворотке крови

Определение желчных кислот в сыворотке крови необходимо в диагностических целях, поскольку аномальное их содержание является признаком нарушения работы печени. Повышенная чувствительность метода микро-ВЭЖХ делает его особенно пригодным для анализа биологических объектов.

Применение методов ВЭЖХ для определения желчных кислот с использованием 3 α -оксистероидной дегидрогеназы (3-HSD) для послеколоночной дериватизации разделенных компонентов описано в работах [4, 5]. Этот метод по разрешающей

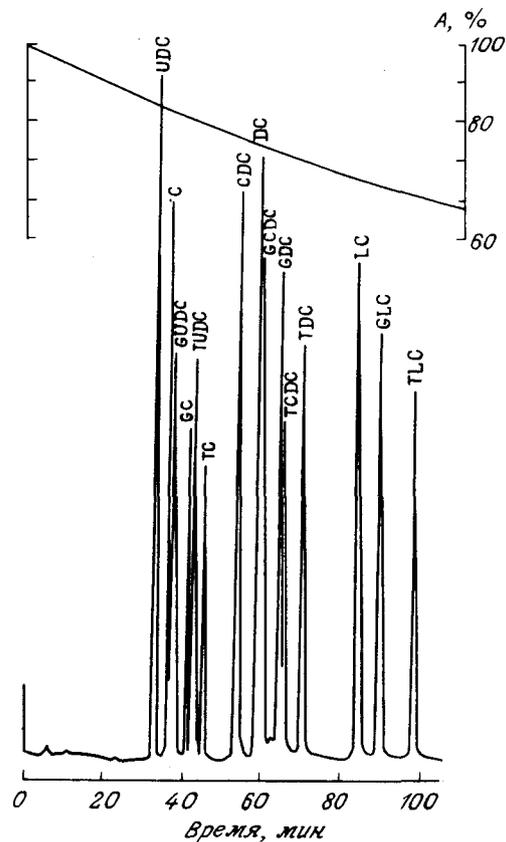


Рис. 7-2. Хроматографическое разделение желчных кислот с применением градиентного элюирования. Колонка 200 мм x 0,26 мм (внутр. диам.); неподвижная фаза силикагель, модифицированный ОДС (5 мкм); подвижная фаза А - ацетонитрил/фосфатный буфер (60 ммоль/л) (рН 9,8)/фосфатный буфер (60 ммоль/л) (рН 8,9), содержащий NAD (18 ммоль/л) (20/70/10), Б - ацетонитрил/фосфатный буфер (60 ммоль/л) (рН 9,5)/фосфатный буфер (60 ммоль/л) (рН 8,9), содержащий NAD (18 ммоль/л) (60/30/10); объемная скорость 2,1 мкл/мин; объем пробы 0,011 мкл. Пики: С - холевая кислота, DC - дезоксихолевая кислота, GDC - гликодезоксихолевая кислота, TDC - тауродезоксихолевая кислота, CDC - хенодезоксихолевая кислота, GCDC - гликохенодезоксихолевая кислота, TCDC - таурохенодезоксихолевая кислота, LC - литохолевая кислота, GLC - гликолитохолевая кислота, TLC - тауролитохолевая кислота, UDC - урсодезоксихолевая кислота, GUDC - гликоурсодезоксихолевая кислота, TUDC - тауроурсодезоксихолевая кислота.

способности, чувствительности и правильности выгодно отличается от методов ГХ, ГХ-МС, тонкослойной хроматографии (ТСХ) и ВЭЖХ с УФ-спектрометром или рефрактометром в качестве детекторов. В данном методе определяемые соединения после их разделения подвергаются воздействию определенных ферментов с тем, чтобы получить такие их производные, которые легче поддаются детектированию. 3-Оксигруппы желчных кислот окисляются до кето-групп, а β -никотинамидадениндинуклеотид (NAD) одновременно восстанавливается до NADH, и это последнее соединение детектируется флуоресцентным методом.

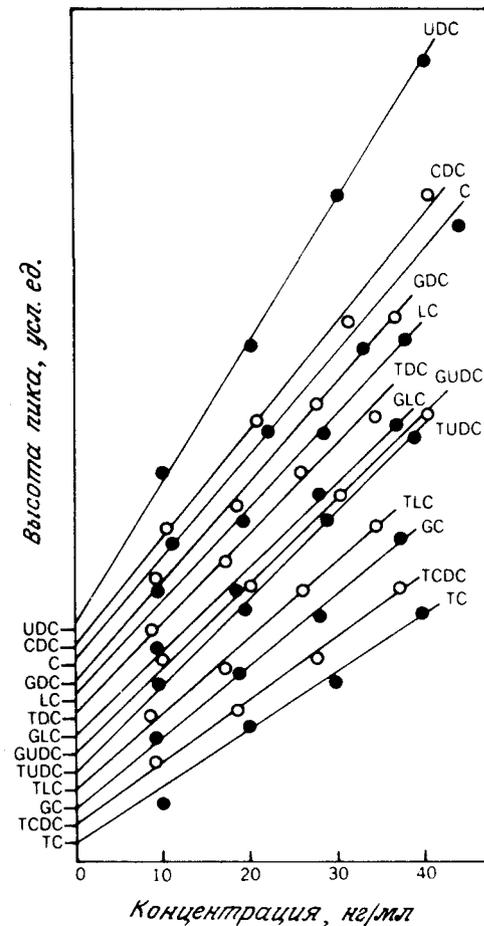


Рис. 7-3. Взаимосвязь между высотой пика и концентрацией кислоты желчи. Объем пробы 1 мл; предколонка 10 мм x 0,2 мм (внутр. диам.); неподвижная фаза силикагель, модифицированный ОДС (15 - 30 мкм). Обозначения те же, что и на рис. 7-2.

На рис. 7-1 показаны блок-схемы систем микро-ВЭЖХ, предназначенных для определения желчных кислот. В системе *a* предусмотрены два насоса, один из которых служит для подачи реагента (NAD). В системе *б* подвижная фаза уже содержит NAD, поэтому дополнительный насос не требуется. Другим преимуществом второй системы является повышение чувствительности вследствие устранения пульсаций потока [6].

Чувствительность определения желчных кислот сильно зависит от pH подвижной фазы. Максимальная чувствительность достигается при pH 10 [7]. Однако для сохранения стабильности разделительной колонки и NAD pH подвижной фазы поддерживается на уровне 9.

На рис. 7-2 показана хроматограмма, полученная при разделении смеси желчных кислот на колонке с силикагелем, модифицированным ОДС. Подвижная фаза содержит NAD в концентрации 1,8 ммоль/л. Желчные кислоты (каждая в количестве примерно 20 нг) детектируются флуоресцентным детектором с чувствительностью, превышающей обычную для ВЭЖХ примерно в 50 раз. Предел обнаружения (при отношении сигнал/шум = 2) составляет 0,13 - 0,28 пмоль.

Желчные кислоты присутствуют в сыворотке крови в очень малых концентрациях. При анализе разбавленных проб

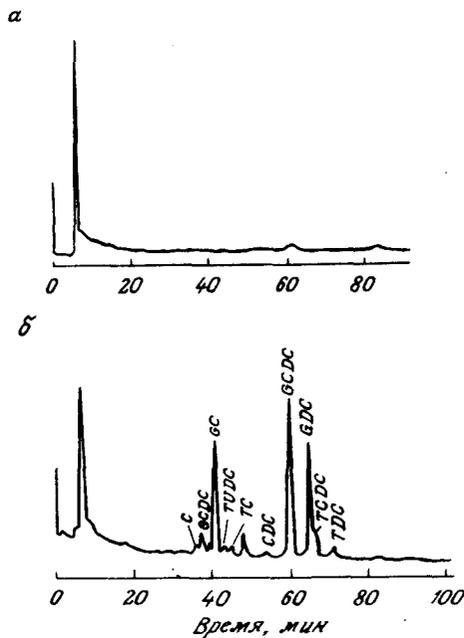


Рис. 7-4. Определение кислот желчи в сыворотке крови здорового человека. Условия опыта те же, что и на рис. 7-2, но объем пробы равен 0,1 мл. *a* - хроматографирование без постколонки, *б* - хроматографирование с постколонкой. Обозначения те же, что и на рис. 7-2.

хорошие результаты дает метод предварительного концентрирования на микроколонке, который подробно описан в гл. 3. Желчные кислоты удовлетворительно концентрируются на предколонке с силикагелем, модифицированным ОДС. При этом сыворотку разбавляют в соотношении 1:10 фосфатным буфером (pH 7-8) [7]. Как следует из рис. 7-3, между концентрацией желчной кислоты и высотой пика наблюдается линейная зависимость.

На рис. 7-4 и 7-5 изображены хроматограммы, полученные при определении желчных кислот в пробах сыворотки крови объемом 0,1 мл, взятых у здорового человека и у больного алкогольным циррозом печени [7]. Верхние хроматограммы получены с применением постколоночной дериватизации; в этих опытах детектировались все флуоресцирующие соединения, отличные от NADH. Содержание желчных кислот, вычис-

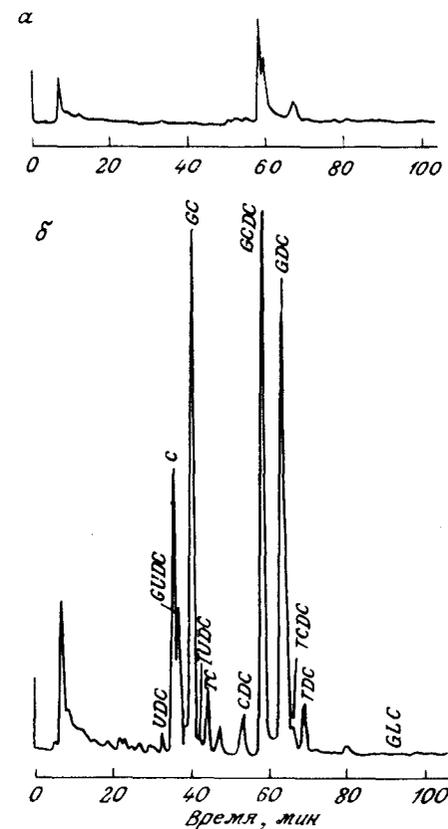


Рис. 7-5. Определение кислот желчи в сыворотке крови пациента, больного циррозом печени. Условия опыта те же, что и на рис. 7-2, но объем пробы равен 0,1 мл. *a* - хроматографирование без постколонки, *б* - с постколонкой. Обозначения те же, что и на рис. 7-2.

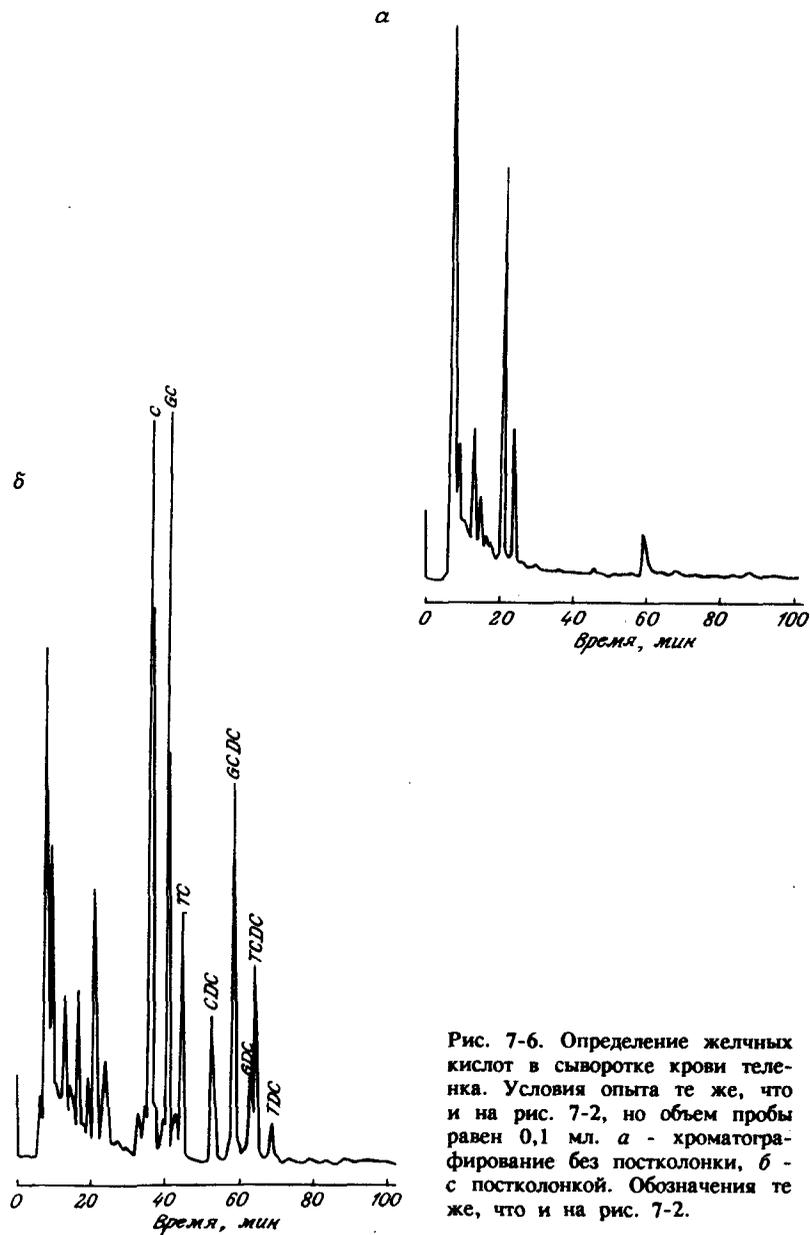


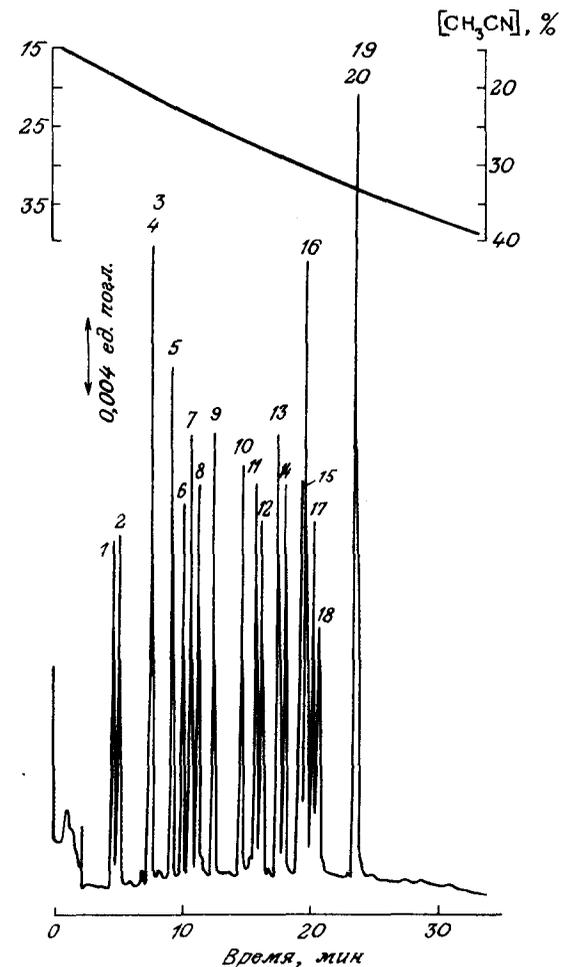
Рис. 7-6. Определение желчных кислот в сыворотке крови теленка. Условия опыта те же, что и на рис. 7-2, но объем пробы равен 0,1 мл. а - хроматографирование без постколонки, б - с постколонкой. Обозначения те же, что и на рис. 7-2.

ленное исходя из нижних хроматограмм рис. 7-4 и 7-5, существенно различается.

На рис. 7-6 приведены хроматограммы желчных кислот, содержащихся в сыворотке крови теленка [8]. Помимо пиков желчных кислот на хроматограммах присутствует много пиков других соединений.

Рис. 7-7. Хроматографическое разделение дансилпроизводных аминокислот с применением градиентного элюирования. Колонка 100 мм x 0,34 мм (внутр. диам.), неподвижная фаза ODS-Hypersil (3 мкм); подвижная фаза ацетонитрил/ацетат аммония (0,13 моль/л), изменение концентрации подвижной фазы в ходе разделения показано на рисунке; объемная скорость 4,2 мкл/мин; детектор УФ, длина волны 222 нм.

Пики: 1 - Asp, 2 - Glu, 3 - Нур, 4 - Asp, 5 - Ser, 6 - Thr, 7 - Gly, 8 - Ala, 9 - Pro, 10 - Val, 11 - Nval, 12 - Met, 13 - Ile, 14 - Leu, 15 - Nleu, 16 - Trp, 17 - Phe, 18 - NH₂, 19 - di-Cys, 20 - Cys. Каждому пику соответствует около 40 пмоль вещества.



7.2.3. Определение аминокислот в соевом соусе и в сакэ*

Анализ аминокислот методом жидкостной хроматографии разрабатывался многими исследователями. В настоящее время одним из самых чувствительных считается ВЭЖХ-метод определения аминокислот в виде дансилпроизводных. Получают указанные производные путем обработки пробы аминокислоты 5-диметиламинонафталинсульфанилхлоридом (дансилхлоридом, или ДНС).

На рис. 7-7 изображена хроматограмма, полученная при градиентном элюировании смеси дансилпроизводных аминокислот; разделение проводилось на колонке, заполненной силикагелем, модифицированным ОДС [9]. Предел обнаружения (при отношении сигнал/шум = 2) составлял около 0,1 пмоль.

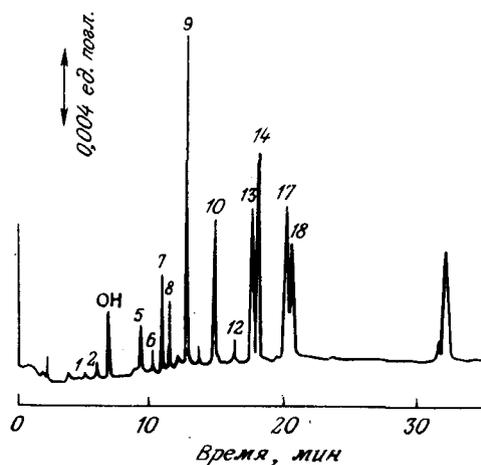


Рис. 7-8. Определение аминокислот в соевом соусе. Условия опыта и нумерация пиков те же, что и на рис. 7-7. ОН - дансиловая кислота.

На рис. 7-8 и 7-9 приведены полученные при градиентном элюировании хроматограммы аминокислот, содержащихся в соевом соусе и сакэ [9]. Чтобы перевести присутствующие в этих образцах аминокислоты в дансилпроизводные рН раствора пробы доводили до 9,7 и обрабатывали реагентом 1 - 2 ч при 38°C. Благодаря высокой концентрации аминокислот в этих объектах объем вводимой пробы мог не превышать 0,02 мкл. Ввод осуществлялся краном-дозатором. Объем анализируемых проб соответствовал 1,3 нл соевого соуса и 11 нл сакэ.

*Японская рисовая водка.

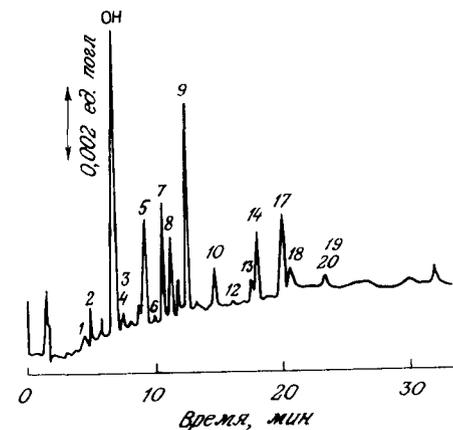


Рис. 7-9. Определение аминокислот в сакэ. Условия опыта и нумерация пиков те же, что и на рис. 7-7. ОН - дансиловая кислота.

7.2.4. Анализ олигомеров

Побочными продуктами производства эпоксидных смол являются соединения, содержащие в качестве концевых либо боковых групп функциональные группы, отличные от эпоксидных. Поскольку эти побочные продукты влияют на качество эпоксидных смол, важно знать их состав и содержание. Для анализа олигомеров эпоксидных смол использовались эксклюзионная хроматография, обращенно-фазовая жидкостная хроматография и масс-спектрометрия с полевой десорбцией. Микро-ВЭЖХ применялась для разделения этих олигомеров как в обращенно-фазовом, так и в эксклюзионном варианте.

Метод микро-ВЭЖХ облегчает работу с длинными колонками с большим числом теоретических тарелок. На рис. 7-10 приведены хроматограммы эпоксидной смолы Epikote 828, полученные методом эксклюзионной хроматографии на микроколонках длиной 50 см и 2 м, заполненных полистирольным гелем с частицами размером 5 мкм. Предел эксклюзии для этого геля по полистирольному стандарту составлял $2 \cdot 10^4$ ед. мол. массы [10]. На хроматограмме б рис. 7-10 пики побочных продуктов расположены между основными пиками ($n = 0$ и $n = 1$). Объемная скорость элюента составляла всего 1 мкл/мин, и на один опыт расходовалось не более 120 мкл подвижной фазы. Такие длинные микроколонки для эксклюзионной хроматографии просты в эксплуатации, и их легко изготовить.

На рис. 7-11 показаны хроматограммы эпоксидной смолы Epikote 1001, разделение которой осуществлено в тех же условиях, что и разделение смолы Epikote 828 (рис. 7-10) [10].

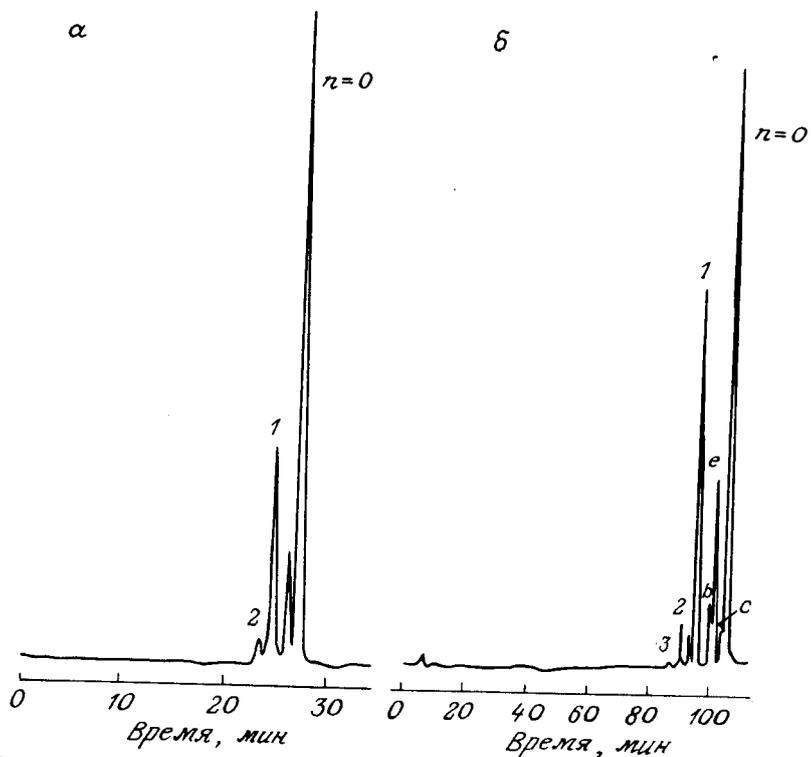


Рис. 7-10. Разделение компонентов эпоксидной смолы Epikote 828. Колонки *a* - внутренний диаметр 0,35 мм, неподвижная фаза полистирольный гель (диаметр зерна 5 мкм) с пределом эксклюзии $2 \cdot 10^4$. *б* - четыре колонки по 0,5 м, соединенные последовательно; подвижная фаза ТГФ; объемная скорость 1,04 мкл/мин; детектор УФ, длина волны 280 нм. Пики: $n = 0 - 3$, олигомеры основного продукта, *b - e* - побочные продукты.

На хроматограмме, полученной с использованием двухметровой колонки, хорошо видны пики побочных продуктов, расположенные между пиками основных продуктов с $n = 1, 2, 3, \dots, 10$. На более короткой колонке наблюдается лишь частичное разделение.

На рис. 7-12 изображена зависимость между логарифмами молекулярных масс олигомеров эпоксидной смолы и временами их удерживания. Нетрудно заметить, что для всех олигомеров, за исключением молекул с $n = 0$, эта зависимость имеет линейный характер [11].

Посредством обращенно-фазовой жидкостной хроматографии обычно удается добиться гораздо лучшего разделения олигомеров, чем эксклюзионным методом. Особенно эффективно раз-

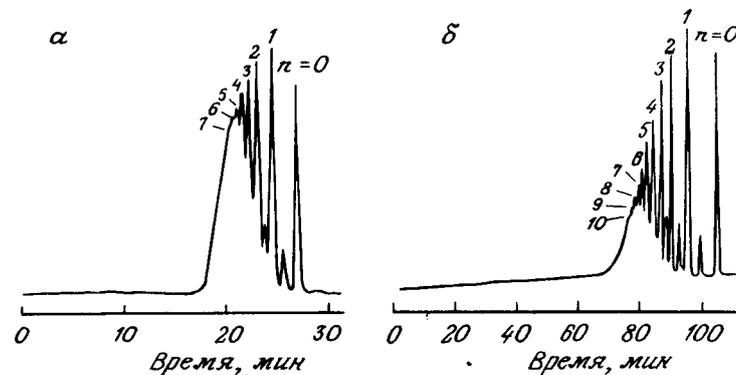


Рис. 7-11. Разделение компонентов эпоксидной смолы Epikote 1001. Условия опыта те же, что и на рис. 7-10. Пики с $n = 0-10$ - эпоксидные олигомеры.

деляются олигомеры при экспоненциальном профиле градиента элюирования. Градиентная система со смесительной камерой,

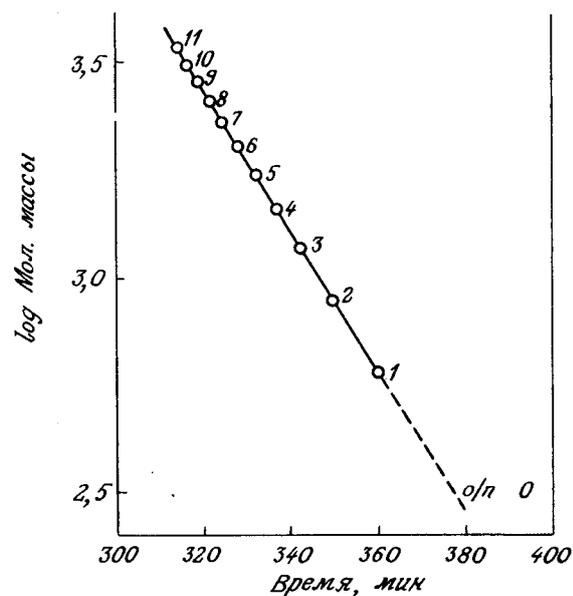


Рис. 7-12. Градуировочный график для определения молекулярной массы. Колонка 4 м x 0,33 мм (внутр. диам.); неподвижная фаза полистирольный гель с пределом эксклюзии полистирола 6×10^4 (TSK-Gel G3000H); подвижная фаза ТГФ; объемная скорость 0,56 мкл/мин. Разделяемый образец Epikote 1001. Цифры 1 - 11 соответствуют степени полимеризации соответствующего эпоксидного олигомера.

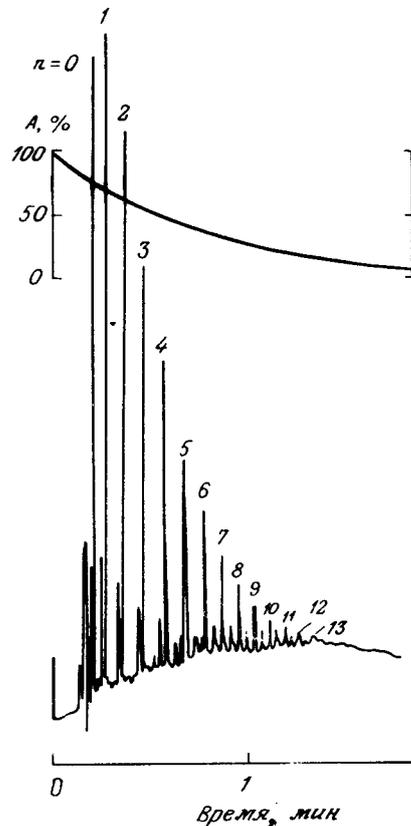


Рис. 7-13. Разделение эпоксидной смолы Epikote 1001 с применением метода градиентного элюирования. Колонка 0,5 м x 0,22 мм (внутр. диам.); неподвижная фаза силикагель, модифицированный ОДС (5 мкм); подвижная фаза *a* - ацетонитрил/вода (85/15), *б* - ацетонитрил/ТГФ (90:10); изменение состава элюента в процессе разделения показано на рисунке; объемная скорость 1,4 мкл/мин; масса пробы 0,16 мкг; детектор УФ, длина волны 225 нм.

обеспечивающая экспоненциальное градиентное элюирование, позволила добиться успеха в разделении олигомеров эпоксидной смолы [12].

На рис. 7-13 и 7-14 приведены хроматограммы, полученные при разделении эпоксидных смол Epikote 1001 и 1004 в режиме градиентного элюирования на колонке внутренним диаметром 0,22 мм и длиной 50 см, заполненной силикагелем, модифицированным ОДС. На хроматограммах видно также множество сопутствующих пиков, которые могут принадлежать хлор- и гидроксилсодержащим соединениям. Разделение на

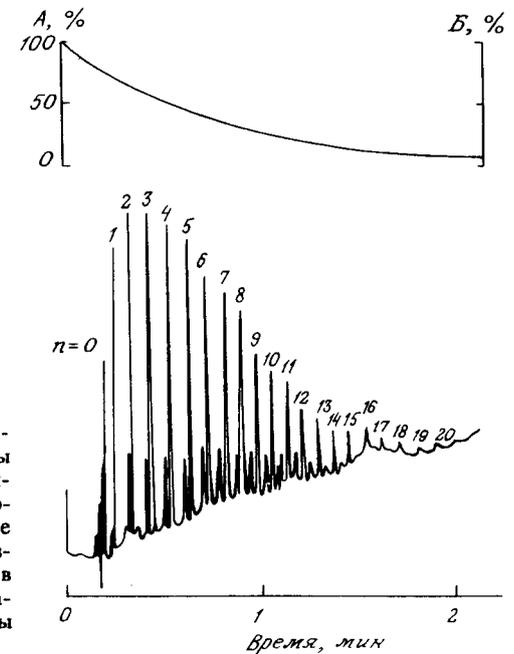


Рис. 7-14. Разделение компонентов эпоксидной смолы Epikote 1004 с использованием метода градиентного элюирования. Условия опыта те же, что и на рис. 7-13. Изменение состава элюента в процессе разделения показано на рисунке. Масса пробы 0,2 мкг.

этой обращенно-фазовой колонке намного лучше, чем на микроколонке для эксклюзионной хроматографии.

На рис. 7-15 представлена хроматограмма смолы Epikote 1001. Разделение осуществлялось на открытой капиллярной колонке длиной 22 м внутренним диаметром 31 мкм, внутренняя поверхность которой была модифицирована ОДС [13]. Разделение на этой колонке несколько хуже, чем на насадочной колонке длиной 0,5 м.

Феноло-формальдегидные смолы получают конденсацией фенола с формальдегидом, и структура образующейся смолы зависит от условий, в которых проводится реакция. Типичными полупродуктами конденсаций являются линейный полиядерный новолак (novolak) и резол (resol) - соединение с большим числом метилольных групп. Поскольку структура и размеры молекул, входящих в состав феноло-формальдегидных смол, очень близки, разделить их на индивидуальные компоненты весьма трудно.

На рис. 7-16 изображены хроматограммы, полученные при разделении феноло-формальдегидных смол методом эксклюзионной хроматографии на колонке 2 м x 0,35 мм (внутр. диам.), заполненной полистирольным гелем с пределом эксклюзии $1 \cdot 10^5$ ед. мол. массы (TSK-GEL G100CH) [10].

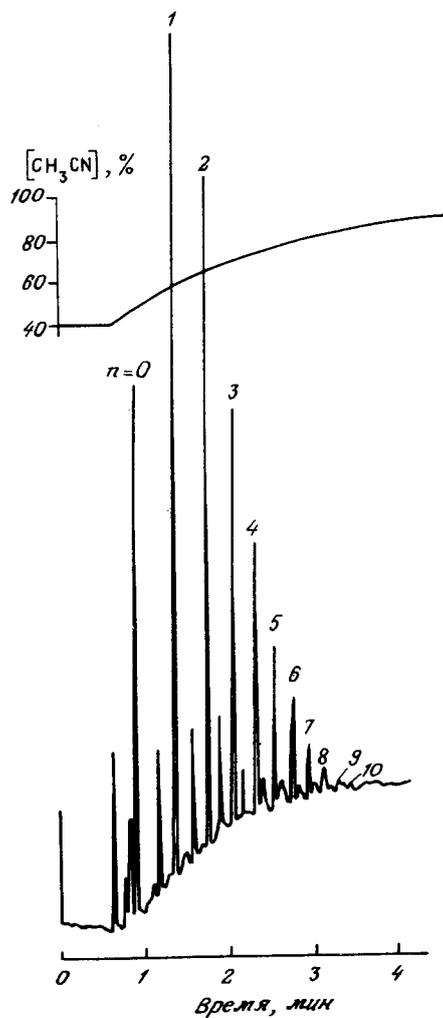


Рис. 7-15. Разделение компонентов эпоксидной смолы Epikote 1001 на открытой капиллярной колонке. Колонка 22 м x 31 мкм (внутр. диам.), материал стекло, внутренние стенки модифицированы ОДС; подвижная фаза ацетонитрил/вода, изменение состава элюента в процессе разделения показано на рисунке; объемная скорость 0,52 мкл/мин; масса пробы 160 нг; температура колонки 44°C; детектор УФ, длина волны 225 нм.

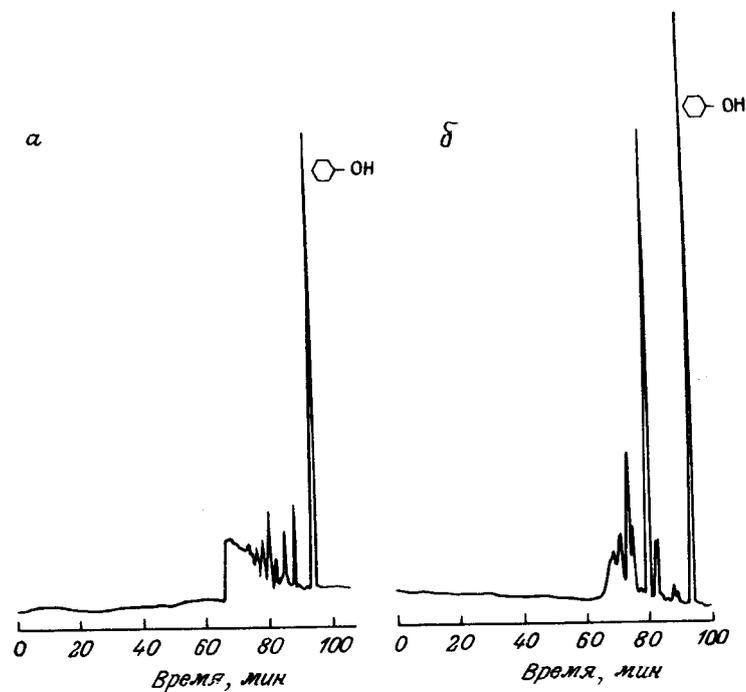


Рис. 7-16. Разделение олигомеров фенолформальдегидной смолы резол (а) и новолак (б). Четыре последовательно соединенных колонки 0,5 м x 0,35 мм (внутр. диам.); неподвижная фаза G1000H; подвижная фаза ТГФ; объемная скорость 1,04 мкл/мин.

7.2.5. Определение органических соединений в воде

Органические соединения, присутствующие в воде в малых концентрациях, успешно определяются методом микро-ВЭЖХ с предварительным концентрированием на дополнительной колонке - предколонке (см. гл. 3, разд. 3.1.3). На рис. 7-17 представлена хроматограмма примесей, перешедших в дистиллированную воду в результате контакта ее с порошком угля. Разделение проводилось в режиме градиентного элюирования на насадочной микроколонке из кварцевого стекла [12]. Благодаря высокой эффективности колонки на хроматограмме можно различить большое число пиков. Однако идентификация этих примесей является трудной задачей, которую можно решить только путем сочетания микро-ВЭЖХ с другими методами исследования, например с масс-спектрометрией.

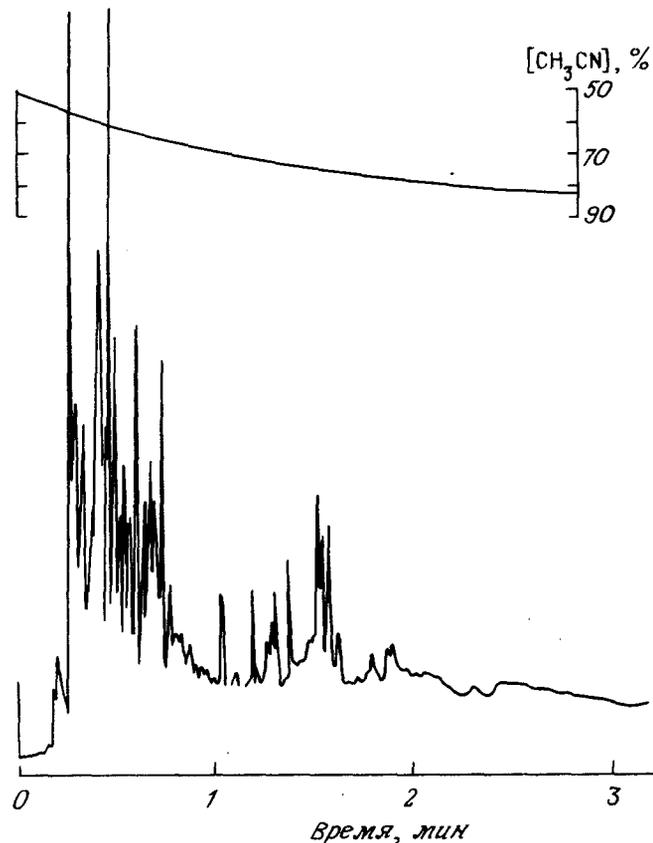


Рис. 7-17. Разделение с использованием градиентного элюирования примесей, содержащихся в дистиллированной воде, находившейся в контакте с порошком угля. Колонка 0,5 м x 0,22 мм (внутр. диам.); неподвижная фаза силикагель, модифицированный ОДС (5 мкм); подвижная фаза ацетонитрил/вода; изменение состава фазы в процессе разделения показано на рисунке; объемная скорость 1,04 мкл/мин; проба 2,5 мл дистиллированной воды, находившейся в контакте с порошком угля. Предколонка 10 м x 0,2 мм (внутр. диам.); неподвижная фаза силикагель, модифицированный ОДС (15-30 мкм); детектор УФ, длина волны 225 нм.

только путем сочетания микро-ВЭЖХ с другими методами исследования, например с масс-спектрометрией.

На рис. 7-18 изображена хроматограмма, полученная при разделении примесей, содержащихся в деионизованной воде [14]. Удерживаемый объем последнего пика хроматограммы совпадает с удерживаемым объемом дибутилфталата (ДБФ).

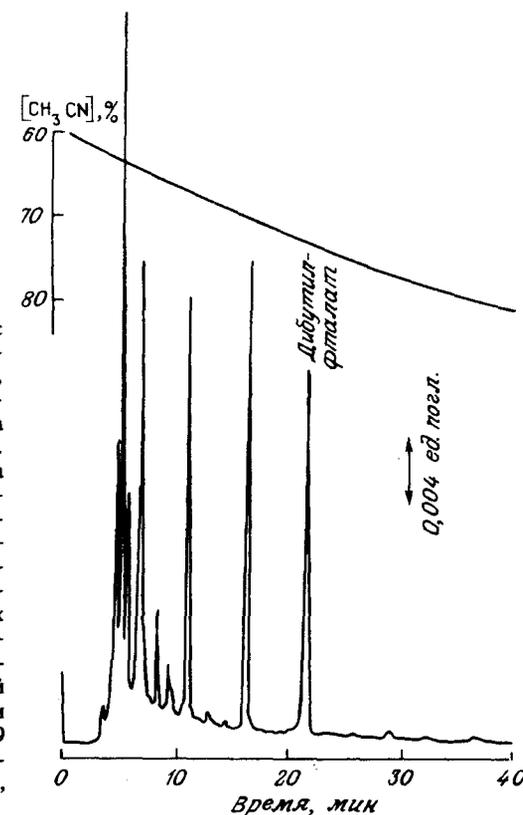


Рис. 7-18. Разделение с использованием градиентного элюирования примесей, содержащихся в деионизованной воде. Колонка 200 мм x 0,26 мм (внутр. диам.); неподвижная фаза силикагель, модифицированный ОДС (5 мкм); подвижная фаза ацетонитрил/вода; объемная скорость 2,08 мкл/мин; предварительная колонка 10 мм x 0,2 мм (внутр. диам.); неподвижная фаза силикагель, модифицированный ОДС (15 - 30 мкм); объем смесительного сосуда 109 мкл; проба 3 мл деионизованной воды; детектор УФ, длина волны 235 нм.

Авторы работы [15] провели быстрое определение ДБФ в воде при помощи хроматографической системы высокого давления с концентрированием на предколонке. На рис. 7-19 показаны хроматограммы, полученные при определении ДБФ в водопроводной воде и в продажной очищенной воде. Найденные концентрации ДБФ равны соответственно 4,5 и $5,4 \cdot 10^{-7}$ %.

7.2.6. Определение антиоксидантов в бензине

Бензин содержит ряд добавок, улучшающих его характеристики, в число которых входят антиоксиданты, препятствующие окислению олефинов и других ненасыщенных компонентов. Определение этих соединений имеет важное значение для оценки стабильности бензина и контроля его качества.

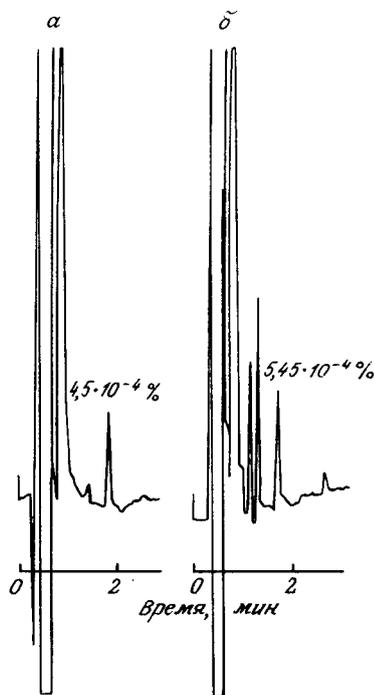


Рис. 7-19. Определение дибutilфталата (ДБФ) в водопроводной воде (а) и в очищенной воде (б). Колонка 100 мм x 0,34 мм (внутр. диам.); неподвижная фаза силикагель, модифицированный ОДС (5 мкм); подвижная фаза ацетонитрил/вода (7/3); предколонка 27 мм x 0,34 мм (внутр. диам.); неподвижная фаза силикагель, модифицированный ОДС (15 - 30 мкм); объемная скорость 20 мкл/мин; объем пробы 0,7 мл; детектор УФ, длина волны 235 нм.

Авторы работы [16] определяли содержание антиоксидантов в бензине, используя метод предварительного концентрирования пробы на микроколонке (см. гл. 3, разд. 3.1.3.). Антиоксиданты типа *p*-фенилендиамин можно концентрировать на предколонках с оксидом алюминия или силикагелем и затем хроматографировать на обращенных фазах. Для такого анализа особенно удобен многоканальный детектор с фотодиодной гребенкой.

На рис. 7-20 представлена хроматограмма смеси различных диаминов и дезактиваторов металла. Колонка 0,34 мм (внутр. диам.) x 150 мм, неподвижная фаза новая кислота, модифицированная ОДС (5 мкм); предколонка 0,2 мм (внутр. диам.) x 10 мм, неподвижная фаза силикагель с размером частиц 10 мкм; подвижная фаза ацетонитрил/вода/*n*-гексилламин (65/35/1); объемная скорость 5,6 мкл/мин; детектор УФ, многоканальный, длина волны 290 нм. а - стандарт, б - 1 мкл бензина.

На рис. 7-21 изображен контурный график пробы бензина, полученный с применением многоканального детектирования. Такие графики удобны при выборе оптимальных условий для последующего детектирования на одной фиксированной длине волны.

7.2.7. Определение компонентов лекарственных средств

На рис. 7-22 представлена хроматограмма, полученная при разделении компонентов лекарственного препарата на открытой безнасадочной капиллярной колонке размером 4,9 м x 52 мкм

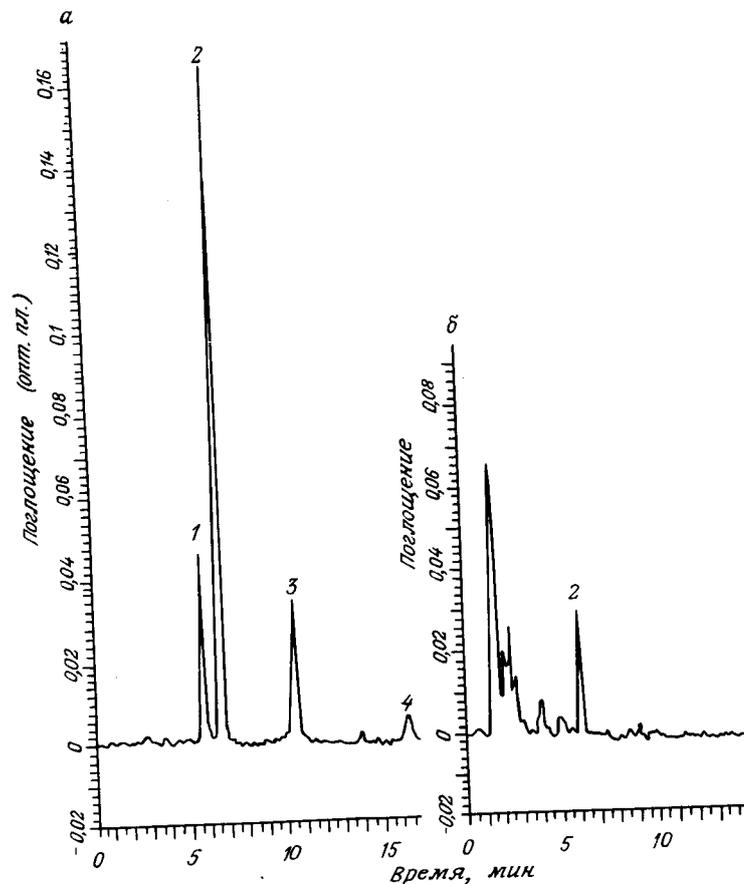


Рис. 7-20. Разделение антиоксидантов и дезактиваторов металла. Колонка 0,34 мм (внутр. диам.) x 150 мм, неподвижная фаза новая кислота, модифицированная ОДС (5 мкм); предколонка 0,2 мм (внутр. диам.) x 10 мм, неподвижная фаза силикагель с размером частиц 10 мкм; подвижная фаза ацетонитрил/вода/*n*-гексилламин (65/35/1); объемная скорость 5,6 мкл/мин; детектор УФ, многоканальный, длина волны 290 нм. а - стандарт, б - 1 мкл бензина.

Пики: 1 - *N,N'*-ди-*втор*-бутил-*p*-фенилендиамин, 2 - *N*-фенил-*N'*-*втор*-бутил-*p*-фенилендиамин, 3 - *N,N*-дисалицилиден-1,2-пропандиамин, 4 - 2,6-ди-*трет*-бутил-*p*-крезол.

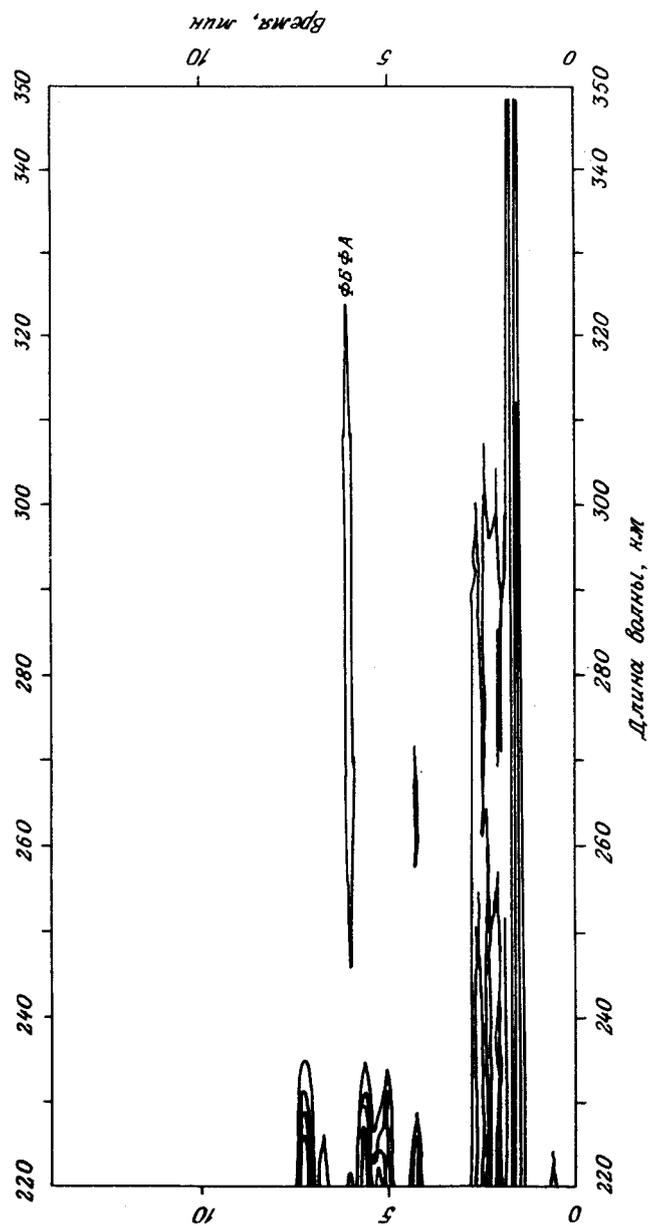


Рис. 7-21. Контурный график пробы бензина, полученный с использованием многоканального спектрометра. Условия разделения те же, что и на рис. 7-20; ФБФА - 1-N-фенил-N-этор-бутил-п-фенилендиамин.

Рис. 7-22. Разделение компонентов лекарственного средства ступенчатым градиентным элюированием. Колонка стеклянная открытая капиллярная, 52 мкм (внутр. диам.) x 4,9 м; внутренняя поверхность модифицирована химически привитым ОДС; подвижная фаза ацетонитрил (а) и 0,05%-ный карбонат аммония (б), соотношение компонентов подвижной фазы показано на рисунке; объемная скорость 1,1 мкл/мин; детектор УФ, 225 нм.

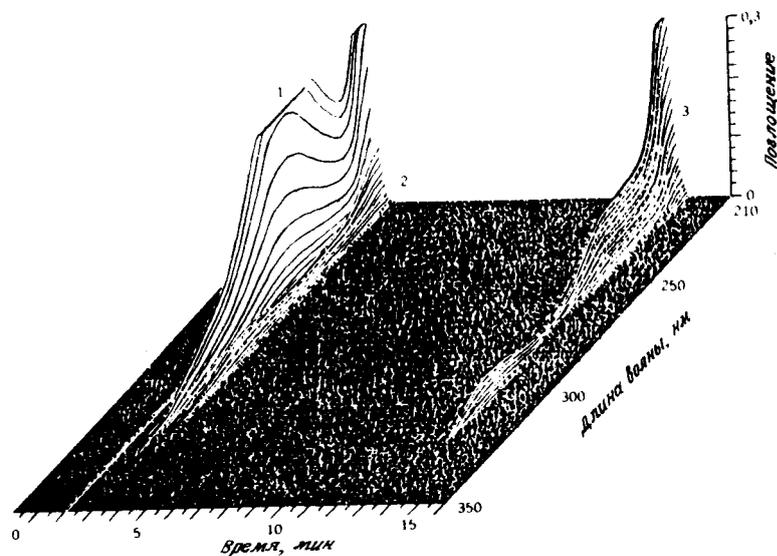
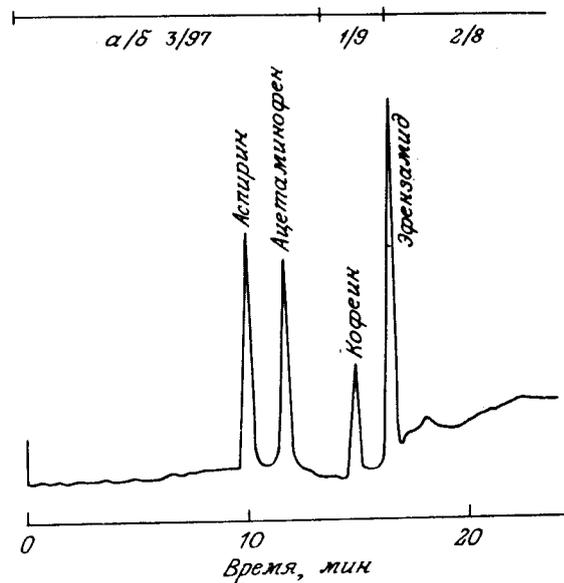


Рис. 7-23. Трехмерная спектрограмма компонентов лекарственного средства. Колонка 0,34 мм (внутр. диам.) x 100 мм; неподвижная фаза гиперсил-ОДС (3 мкм); подвижная фаза ацетонитрил/метанол/фосфатный буфер (60 ммоль/л, рН 3,1) (14/6/80); объемная скорость 4,2 мкл/мин. Пики: 1 - ацетаминофен, 2 - кофеин; 3 - эфедрин.

(внутр. диам.), внутренняя поверхность которой модифицирована ОДС. Препарат растворяли в 10 мл 5%-ного водного раствора ацетонитрила и пробу (0,02 мкл) вводили в колонку.

Приборы с многоканальными детекторами имеют много преимуществ перед обычными спектрофотометрами, работающими на одной фиксированной длине волны. В работе [18] описано применение микро-ВЭЖХ в сочетании со спектральным детектором с фотодиодной гребенкой, работающим в УФ-и видимом диапазоне, в аналогичных целях, т. е. для определения состава лекарственного средства. На рис. 7-23 показана полученная трехмерная спектрохроматограмма. Для идентификации каждого из компонентов на рисунке достаточно сравнить его время удерживания и спектр с соответствующими характеристиками стандартного вещества. На рис. 7-24 даны контурные графики разделенных компонентов.

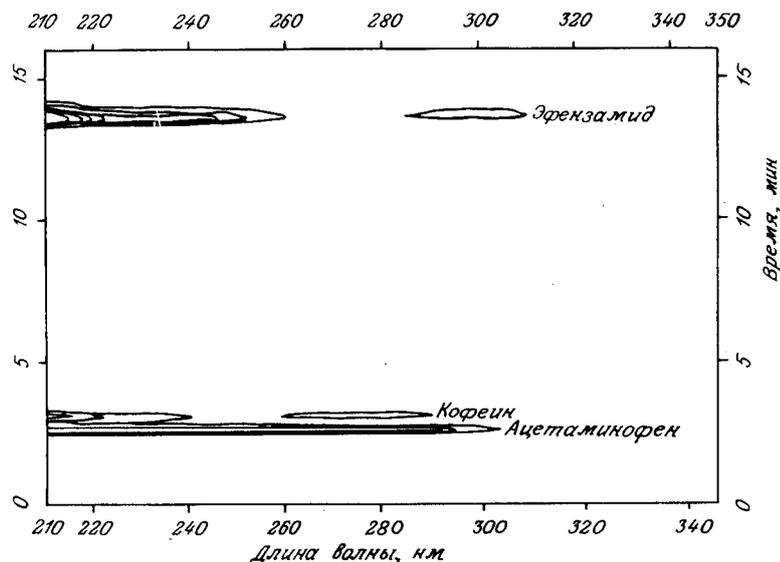


Рис. 7-24. Контурный график компонентов лекарственного средства, полученный с использованием многоканального спектрометра. Условия разделения те же, что и на рис. 7-23. График построен в интервале 0,02 - 0,3 ед. погл. с шагом в 0,03 ед.

7.2.8. Определение теофиллина в сыворотке крови

Высокоэффективная жидкостная хроматография имеет большое значение для определения содержания различных ле-

карственных средств в крови. В качестве типичного примера можно привести определение теофиллина, часто назначаемого в качестве антиастматического средства. Теофиллин эффективен только в узком интервале его концентраций в крови, кроме того, продукты его метаболизма у разных людей бывают весьма различными, поэтому его содержание в крови необходимо контролировать у каждого пациента. Ивай и сотр. [19] определяли концентрацию теофиллина в сыворотке крови методом ВЭЖХ на короткой фторопластовой микроколонке (15 см x 0,5 мм (внутр. диам.)), заполненной пористым полистирольным гелем с частицами размером 10 мкм. Роль внутреннего стандарта выполнял 8-хлортеофиллин. Точность определения была высокой; относительное стандартное отклонение не превышало 1%. На рис. 7-25 приведена подробная схема предварительной обработки пробы, посредством которой удается удалить из анализируемой сыворотки до 99% содержащегося в ней белка при выходе теофиллина не менее 95%. На рис. 7-26 изображена типичная хроматограмма сыворотки крови одного из пациентов.

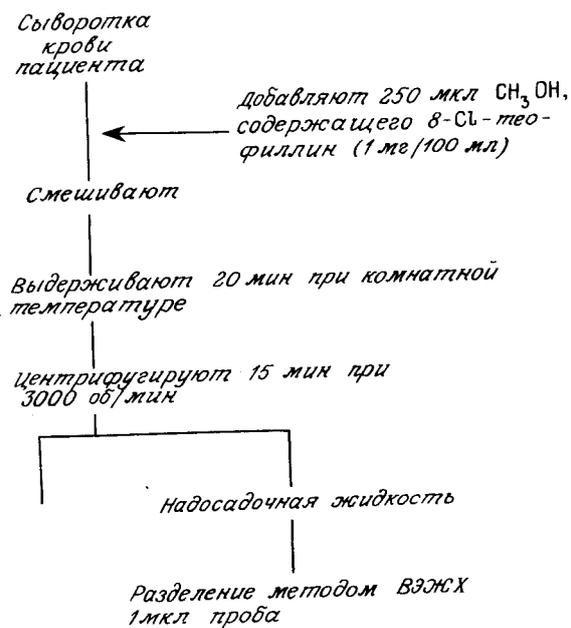


Рис. 7-25. Предварительная обработка пробы при определении теофиллина в сыворотке крови.

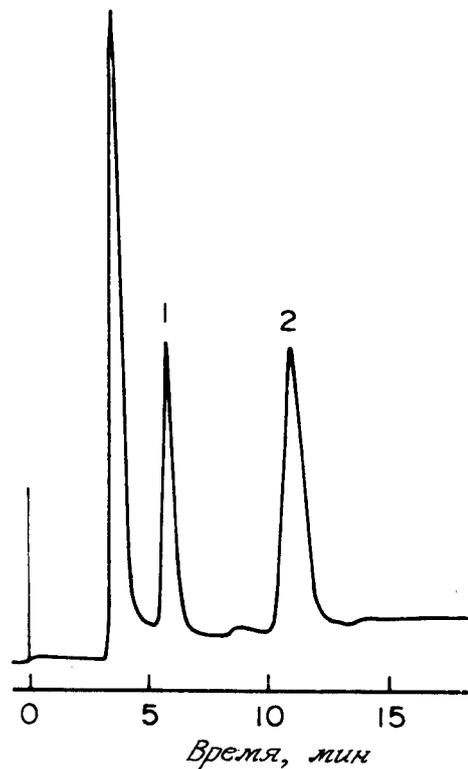


Рис. 7-26. Типичная хроматограмма сыворотки крови. Колонка 0,5 мм (внутр. диам.) x 15 см; неподвижная фаза Fine GEL 110; подвижная фаза метанол/дистиллированная вода/уксусная кислота (70/30/1); объемная скорость 8 мкл/мин; детектор УФ, 273 нм; объем пробы 1 мкл.

Пики: 1 - теofilлин, 2 - 8-хлортеofilлин (внутренний стандарт).

7.2.9. Сочетание микро-ВЭЖХ и тонкослойной хроматографии

Тонкослойная хроматография (ТСХ) часто используется в процессе подготовки пробы для разделения методом ВЭЖХ с целью выделения какой-либо одной фракции. Однако очень часто количество вещества, которое удается при этом получить, слишком мало. В таких случаях целесообразно прибегнуть к микро-ВЭЖХ, которая позволяет анализировать с высокой чувствительностью малые пробы.

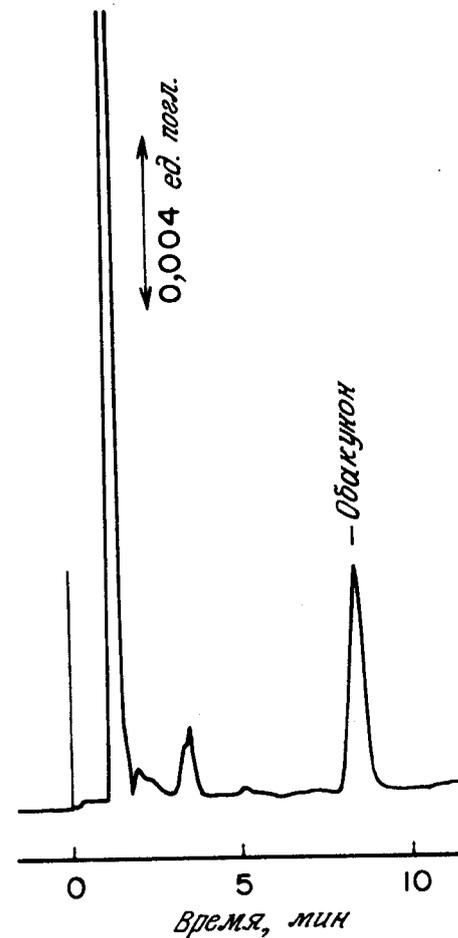


Рис. 7-27. Определение обакунона после предварительного разделения пробы методом ТСХ. Колонка 0,5 мм (внутр. диам.) x 18 см; Fine SIL C₁₈; подвижная фаза ацетонитрил/0,1%-ная фосфорная кислота (50/50); объемная скорость 15 мкл/мин; детектор УФ, 210 нм; объем пробы 0,1 мкл.

Моришита и сотр. описали успешное определение обакунона и нарингина в плодах цитрусовых путем сочетания микро-ВЭЖХ и ТСХ [20]. Искомые соединения экстрагировали из обезжиренных семян летних апельсинов, экстракт подвергали предварительному разделению методом ТСХ с дихлорметаном в качестве подвижной фазы. Пятно, которое предположительно (устанавливалось сравнением с тонкослойной хроматограммой

стандарта) принадлежало обакунону, соскабливали с пластинки, экстрагировали порошок ацетоном и отгоняли последний. После этого пробу анализировали методом ВЭЖХ для окончательной идентификации обакунона. На рис. 7-27 изображена типичная хроматограмма, полученная описанным способом.

7.2.10. Применение флуоресцентного детектирования в микро-ВЭЖХ

Хиби и Канеучи сконструировали проточную микрокювету для флуоресцентного детектора с камерой объемом 0,6 мкл, которая пригодна для микро-ВЭЖХ на фторопластовой колонке внутренним диаметром 0,5 мм. Сочетание микро-ВЭЖХ с высокочувствительным флуоресцентным детектором позволяет добиться очень высокой чувствительности [21].

На рис. 7-28 показана хроматограмма, полученная при высокочувствительном детектировании многоядерных ароматических углеводородов. Из рисунка видно, что авторам работы удалось определить чрезвычайно малые (5 и 14 нг) количества искомым компонентов при весьма высоком отношении сигнал/шум.

На рис. 7-29 показана хроматограмма изомеров канцерогенного нафтиламина, полученная с применением высокочувствительного детектирования. В данном эксперименте на микроколонке, заполненной силикагелем (5 мкм), удалось разделить очень малые количества α - и β -нафтиламина (по 1,7 пмоль каждого). Детектирование осуществлялось флуоресцентным детектором.

Высокочувствительное определение витамина В2 показано на рис. 7-30. Авторам работы удалось обнаружить в пробе всего 0,15 пмоль искомого соединения при весьма высоком отношении сигнал/шум.

На рис. 7-31 представлена хроматограмма, полученная при высокочувствительном определении производных полиаминов. Существует мнение, что содержащиеся во многих биологических объектах полиамины служат регулирующим фактором в процессах синтеза белка и размножения клеток. Имеются также сообщения о возрастании концентрации полиаминов в моче пациентов с онкологическими заболеваниями. Все это потребовало разработки высокочувствительных методов определения полиаминов в биологических объектах. В рассматриваемом примере полиамины переводились во флуоресцирующие производные путем обработки специальным флуоресцирующим реагентом (флуорескамин), который присоединялся к аминогруппам молекул полиаминов. Полученные флуоресцирующие соединения разделялись и определялись методом микро-ВЭЖХ. В

одном опыте удавалось определять очень малые (до 0,2 пмоль) количества полиаминов.

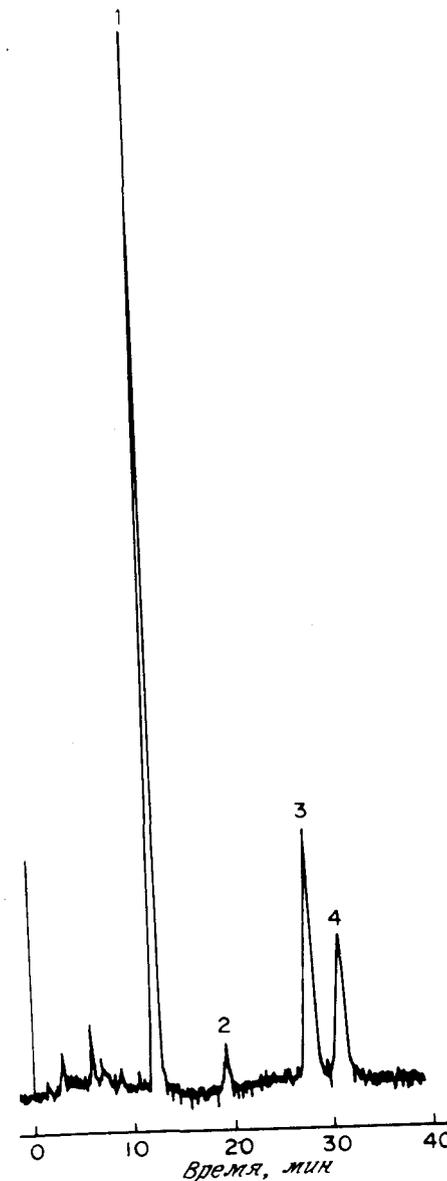


Рис. 7-28. Высокочувствительное определение многоядерных ароматических углеводородов с применением флуоресцентного детектора. Колонка 0,5 мм (внутр. диам.) x 16,7 см; неподвижная фаза Fine SIL C₁₈; подвижная фаза ацетонитрил/дистиллированная вода (80/20); объемная скорость 6 мкл/мин; длина волны возбуждающего излучения 254 нм, флуоресцентного излучения 430 нм.

Пики: 1 - антрацен (7 нг), 2 - хризен (14 нг), 3 - перилен (9 нг), 4 - бенз(а)пирен (5 нг).

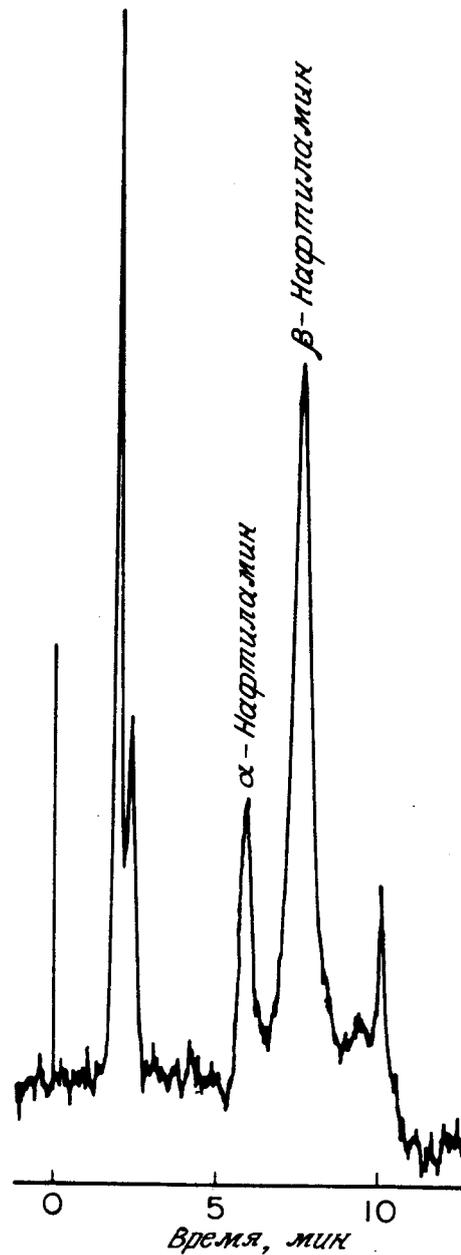
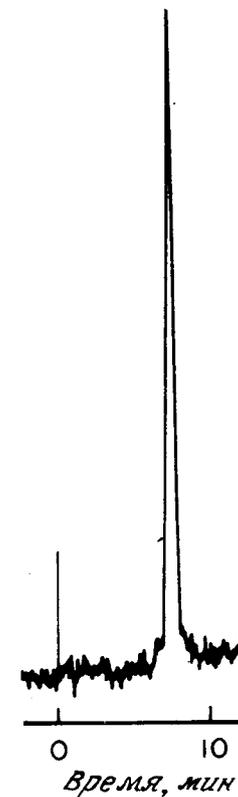


Рис. 7-29. Разделение и высокочувствительное определение изомеров нафтиламина. Колонка 0,5 мм (внутр. диам.) x 15 см; неподвижная фаза Fine SIL; подвижная фаза *n*-гексан/изопропанол (97/3); объемная скорость 15 мкл/мин; длина волны возбуждающего излучения 254 нм, флуоресцентного излучения 373 нм.

Рис. 7-30. Высокочувствительное определение витамина В2. Колонка фторопластовая 0,5 мм (внутр. диам.) x 17,9 см; неподвижная фаза нуклеосил NH₂; подвижная фаза ацетонитрил/фосфатный буфер (0,005 моль/л) (75/25); объемная скорость 6 мкл/мин; длина волны возбуждающего излучения 365 нм, флуоресцентного излучения 530 нм; проба 15 пмоль витамина В2.



7.2.11. Применение сжиженных газов в качестве подвижной фазы

Вязкость сжиженных газов должна в принципе быть меньше вязкости растворителей обычных для ВЭЖХ. Следовательно, если роль подвижной фазы выполняет сжиженный газ, эффективность хроматографического разделения должна повыситься. Использовать низкокипящие растворители в микро-ВЭЖХ можно в том случае, если давление в системе превышает давление паров подвижной фазы. В табл. 7-1 приведены коэффициенты диффузии бензола в сжиженных алканах, рассчитанные по уравнению Оуано [22, 23]. Величина ВЭТТ зависит от коэффициента диффузии, и при одной и той же скорости подвижной фазы она тем меньше, чем больше коэффициент

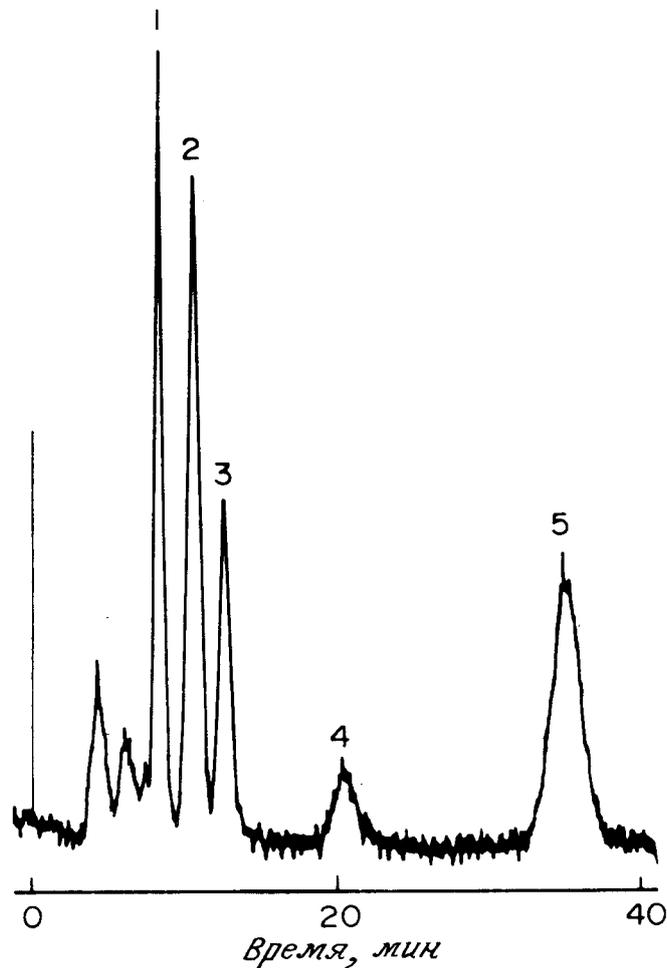


Рис. 7-31. Разделение и высокочувствительное определение производных полиаминов. Колонка 0,5 мм (внутр. диам.) x 16,8 см; неподвижная фаза лихросорб RP-8; подвижная фаза ацетонитрил/борная кислота (0,1 моль/л) (рН 8,0, 29/71); объемная скорость 5 мкл/мин; длина волны возбуждающего излучения 365 нм, флуоресцентного излучения 485 нм. В пробе содержится по 0,2 пмоль каждого из компонентов.

Пики: 1 - путресцин, 2 - кадаверин, 3 - спермидин, 4 - спермин, 5 - 1,8-октандиамин (внутренний стандарт).

диффузии растворителя. Как уже указывалось в гл. 3 (разд. 3.2), при работе с открытыми безнасадочными капиллярными

колонками в ЖХ лучшие результаты дают подвижные фазы с более низкомолекулярными алканами.

Типичные хроматограммы, полученные при разделении многоядерных ароматических углеводородов (ПАУ) с *n*-бутаном и пропаном в качестве элюентов, приведены на рис. 7-32. Удерживание разделяемых компонентов зависит как от структуры молекул растворителя, так и от числа атомов углерода в его молекуле. Если растворителем служит алкан с разветвленной цепью, удерживание больше, чем при применении растворителя нормального строения с тем же числом атомов углерода в молекуле.

На рис. 7-33 показано разделение ароматических аминов и ПАУ на колонке, заполненной полистирольным гелем, со сжиженным диметилловым эфиром в качестве подвижной фазы [24]. Удерживание разделяемых веществ зависит прежде всего

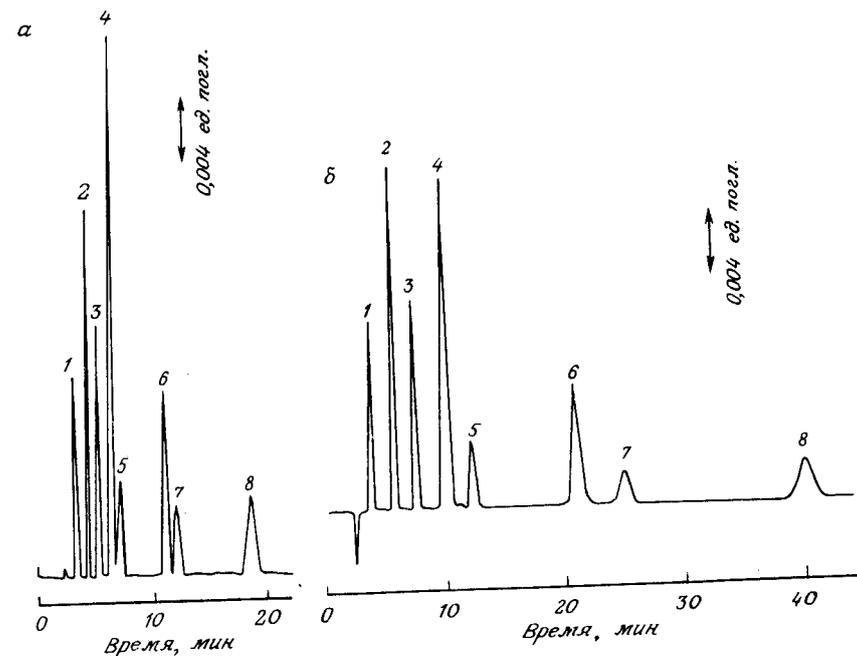


Рис. 7-32. Типичные примеры разделения многоядерных ароматических углеводородов с применением низкомолекулярных алканов в качестве подвижной фазы. Колонка 0,5 мм (внутр. диам.) x 125 мм; неподвижная фаза силикагель, 5 мкм (девелосил 100-5); подвижная фаза *n*-бутан (а), пропан (б); объемная скорость 10 мкл/мин; детектор УФ, 254 нм.

Пики: 1 - бензол, 2 - нафталин, 3 - бифенил, 4 - антрацен, 5 - пирен, 6 - хризен, 7 - бенз(а)пирен, 8 - 1,3,5-трифенилбензол.

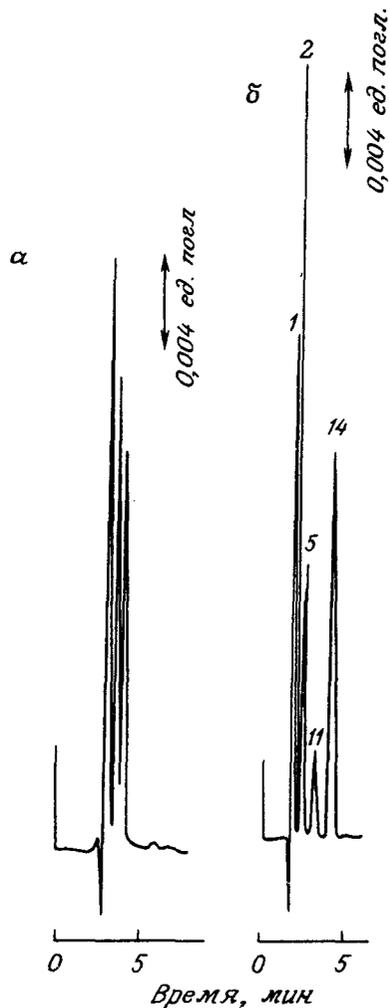


Рис. 7-33. Разделение ароматических соединений с применением диметилового эфира в качестве подвижной фазы. Колонка 0,26 мм (внутр. диам.) x 103 мм; неподвижная фаза полистирольный гель (TSK-GEL G1000P); объемная скорость 1,4 мкл/мин (а) и 2,8 мкл/мин (б); детектор УФ, 235 нм (а) и 265 нм (б).

а - последовательно элюируются анилин, α -нафтиламин и N-фенил- α -нафтиламин; б: 1 - бензол, 2 - нафталин, 5 - антрацен, 11 - нафтацен, 14 - бенз(а)пирен.

от числа ароматических колец в молекуле; вещества с большим числом колец элюируются позднее.

Такеучи и Исии [24] исследовали возможность элюирования из колонки полярных соединений смесью двух растворителей с раздельной подачей каждого из них. Состав элюента изменяли путем изменения отношения скоростей подачи растворителей. Применение низкокипящих растворителей было в данном случае совершенно безопасным, поскольку расход элюента в микро-ВЭЖХ очень мал.

Таблица 7-1. Коэффициенты диффузии бензола в алканах

Алкан	Коэффициент диффузии, $\text{н.}10^{-5}, \text{см}^2/\text{с}$
n-Гексан	4,4
n-Пентан	5,5
2,2-Диметилпропан	4,8
n-Бутан	6,9
2-Метилпропан	7,0
Пропан	10

7.2.12. Применение сверхкритической флюидной хроматографии

Сверхкритическая флюидная хроматография (СФХ) была впервые экспериментально осуществлена Клеспером и сотр. [25]. Сверхкритические жидкости имеют плотности, близкие к обычным жидкостям, но вязкость их меньше, а коэффициенты диффузии растворенных в них веществ больше. Поэтому при применении таких жидкостей в качестве подвижных фаз удастся добиться минимальной высоты, эквивалентной теоретической тарелке, при больших линейных скоростях, чем в ВЭЖХ. Чаще всего подвижными фазами в СФХ служат n-пентан и диоксид углерода. Последний имеет целый ряд преимуществ по сравнению с растворителями, обычными для ВЭЖХ: он нетоксичен, негорюч, отличается высокой прозрачностью в коротковолновой УФ-области спектра, у него низкая критическая температура (31°C), и он относительно дешев.

На рис. 7-34 приведена схема установки для СФХ [26]. Из баллона, снабженного сифоном, жидкий диоксид углерода при комнатной температуре нагнетается насосом в колонку.

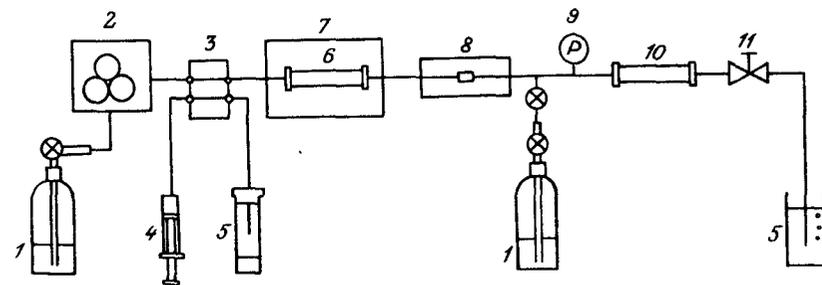


Рис. 7-34. Схема установки для сверхкритической флюидной хроматографии. 1 - баллон с диоксидом углерода; 2 - насос; 3 - миниатюрный кран-дозатор; 4 - ввод пробы; 5 - сброс или сосуд для отработанного раствора; 6 - разделительная колонка; 7 - термостат; 8 - УФ-детектор; 9 - манометр; 10 - колонка для создания противодавления; 11 - игольчатый вентиль.

Цилиндр насоса охлаждается сухим льдом, чтобы повысить эффективность его работы. Второй баллон с жидким диоксидом углерода подключается в точке между выходом детектора и выводной трубкой, соединяющейся с атмосферой. Однако можно обойтись и без этого баллона, если использовать фитинги и соединительные трубки с малым мертвым объемом. Вся система, включая дозатор, колонки и проточную кювету детектора, рассчитана на большое давление.

На рис. 7-35 показана хроматограмма разделения ПАУ на колонке 150 мм x 0,34 мм (внутр. диам.), заполненной силикагелем, модифицированным ОДС [26]. Давление на входе составляло 150 кг/см², температура колонки 35°C. Все пики разделенных компонентов имеют симметричную форму. На рис. 7-36 представлена хроматограмма олигомеров стирола, разделение которых было осуществлено на той же колонке [26]. Хотя детектирование проводилось при весьма малой дли-

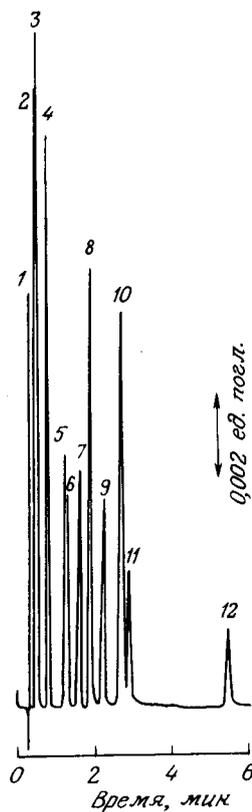


Рис. 7-35. Разделение многоядерных ароматических углеводородов методом сверхкритической флюидной хроматографии. Колонка 0,34 мм (внутр. диам.) x 150 мм; неподвижная фаза кремневая кислота, модифицированная ОДС (5 мкм); подвижная фаза диоксид углерода; давление на выходе 150 кг/см²; температура колонки 35°C; детектор УФ, 245 нм; проба: раствор многоядерных ароматических углеводородов в ацетонитриле.

Пики: 1 - бензол, 2 - нафталин, 3 - бифенил, 4 - флуорен, 5 - фенантрен, 6 - антрацен, 7 - *n*-терфенил, 8 - 9-фенилантрацен, 9 - флуорантен, 10 - 1,3,5-трифенилбензол, 11 - пирен, 12 - хризен.

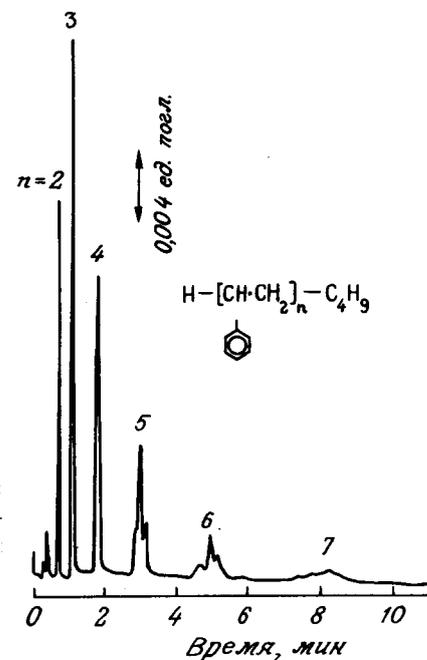


Рис. 7-36. Разделение олигомеров стирола методом сверхкритической флюидной хроматографии. Колонка та же, что и на рис. 7-35; подвижная фаза диоксид углерода; давление на входе 150 кг/см²; температура колонки 34,5°C; детектор УФ, 205 нм; проба полистирол А-500. Нумерация пиков соответствует числу *n* в формуле.

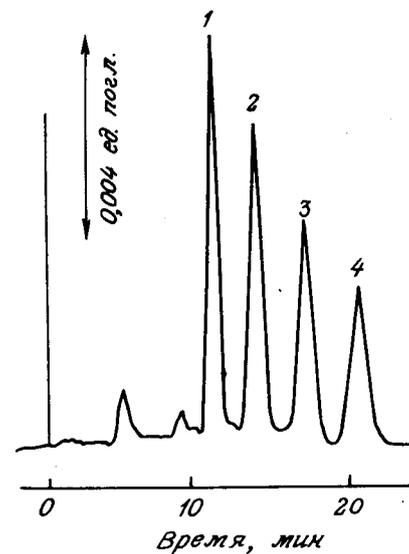


Рис. 7-37. Разделение сахаридов с их непосредственным детектированием с помощью УФ-детектора. Колонка фторопластовая 0,5 мм (внутр. диам.) x 15 см, неподвижная фаза нуклеосил NH₂; подвижная фаза ацетонитрил/дистиллированная вода (70/30); объемная скорость 5 мкл/мин; детектор УФ, 190 нм; объем пробы 1,9 мкл; проба 0,5%-ный раствор определяемых соединений в подвижной фазе.

Пики: 1 - ксилоза, 2 - глюкоза, 3 - фруктоза, 4 - лактоза. Каждый пик соответствует 9,5 мкг вещества.

не волны (205 нм), нулевая линия очень ровная благодаря высокой прозрачности диоксида углерода. На хроматограмме видны также пики разделенных диастереоизомеров.

Список соединений, которые можно хроматографировать с диоксидом углерода в качестве подвижной фазы ограничен ввиду полярности этого растворителя. Поэтому желательно разработать вариант микро-СФХ, допускающий введение в подвижную фазу модификатора, изменяющего ее полярность.

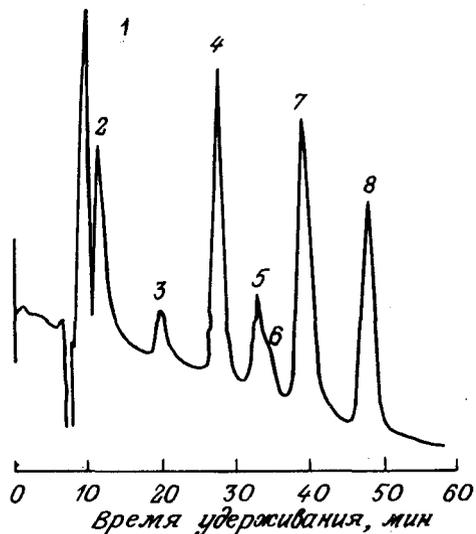


Рис. 7-38. Хроматограмма экстракта, содержащего хелатные комплексы диэтилдитиокарбамата кадмия (II), марганца (II), свинца (II), кобальта (II), железа (III), цинка (II) и меди (II). Колонка 0,5 мм (внутр. диам.) x 15 см; неподвижная фаза силикагель, модифицированный ОДС (5 мкм); подвижная фаза метанол/этилацетат/вода/раствор диэтилдитиокарбамата натрия (0,05 моль/л) (66,5/5/24/5); объемная скорость 4 мкл/мин; детектор УФ, 265 нм; объем пробы 0,4 мкл.

Пики и концентрации (мкг/мл) соответствующих металлов в водном растворе: 1 - кадмий (5), 2 - хлороформ, 3 - марганец (0,5), 4 - свинец (6), 5 - кобальт (5), 6 - железо (2), 7 - цинк (4), 8 - медь (2).

7.2.13. Другие области применения микро-ВЭЖХ

Примеров применения ВЭЖХ опубликовано чрезвычайно много. На рис. 7-37 показано, например, разделение сахаридов с последующим детектированием их УФ-детектором. Разделение осуществлялось методом микро-ВЭЖХ без какой-либо предварительной обработки разделяемых веществ, детектирова-

ние проводилось при длине волны 190 нм. При работе с проточной кюветой длиной 10 мм, обычной для ВЭЖХ, детектировать при очень малых длинах волн (порядка 190 нм) нельзя из-за заметного поглощения ацетонитрила, являющегося одним из компонентов подвижной фазы. Однако в микро-ВЭЖХ возможно прямое детектирование сахаридов даже на длине волны 190 нм, поскольку поглощение ацетонитрила в элюате уменьшается примерно в 30 раз по сравнению с обычной проточной кюветой благодаря тому, что длина проточной микрокюветы объемом 0,3 мкл составляет всего 0,3 мм.

Проведено уникальное исследование по применению микро-ВЭЖХ для одновременного количественного определения в воде следов химических элементов - свинца, цинка и меди [27]. Ионы металлов экстрагировали из водной фазы хлороформом в виде диэтилдитиокарбаматных хелатов и экстракт вводили непосредственно в микроколонку для ВЭЖХ. Типичная хроматограмма представлена на рис. 7-38. Авторы этой работы пользовались описанным методом для определения ионов металлов в речной воде. Согласно их сообщению, результаты анализа хорошо согласуются с данными, полученными методом атомно-абсорбционной спектроскопии.

7.3. ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛУМИКРО-ВЭЖХ

7.3.1. Введение

В полумикро-ВЭЖХ разделение проводится на колонках объемом примерно в 10 раз меньшим объема обычных колонок. Этот метод, на первый взгляд, не имеет перед обычной ВЭЖХ столь очевидных преимуществ (меньшая стоимость и высокая чувствительность), как собственно микро-ВЭЖХ, в которой разделение ведется на колонках объемом еще в 10 раз меньшим. Однако, если исходить из особенностей ее практического применения, полумикро-ВЭЖХ имеет целый ряд преимуществ:

1. Полумикро-ВЭЖХ почти столь же проста, как и обычная ВЭЖХ, тогда как собственно микро-ВЭЖХ требует специальных навыков, особых методов и большой тщательности.

2. В режиме полумикро-ВЭЖХ нетрудно осуществить как градиентное элюирование, так и послеколоночную дериватизацию разделенных соединений.

3. Колонки и приборы, предназначенные для полумикро-ВЭЖХ, выпускаются несколькими фирмами.

Эти преимущества способствуют широкому распространению метода в аналитических лабораториях. Кроме того, они стимулируют переход от обычной ВЭЖХ к полумикро-ВЭЖХ.

Изучение существующих тенденций показывает, что полумикро-ВЭЖХ быстро завоевывает все новые области, что, несомненно, объясняется главным образом ее тремя указанными выше преимуществами. В настоящем разделе мы опишем несколько наиболее интересных примеров практического применения полумикро-ВЭЖХ.

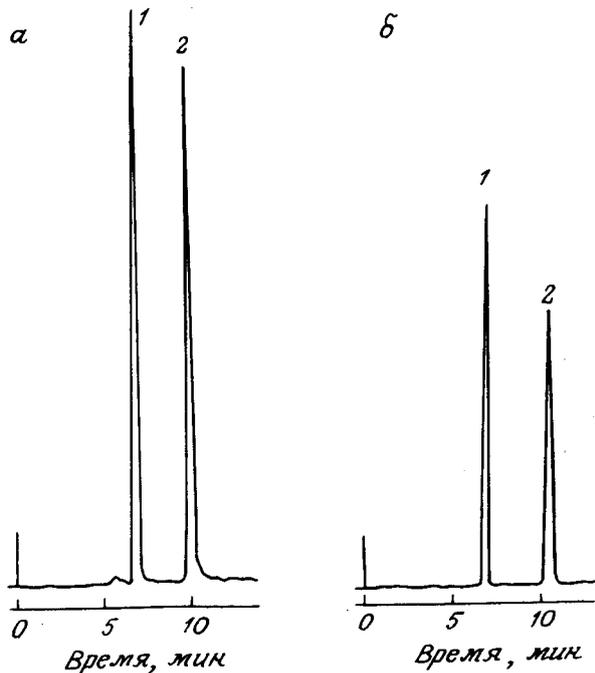


Рис. 7-39. Сравнение времен удерживания и эффективности колонок.

а: полумикро-ВЭЖХ. Насос FAMILIC-300 S; детектор UVIDEC-100-III; колонка MS-Finapak SIL C₁₈, 1,5 мм (внутр. диам.) x 25 см; подвижная фаза ацетонитрил/вода (75/25); объемная скорость 100 мкл/мин. Пики: 1 - нафталин, 2 - антрацен; *б:* обычная ВЭЖХ. Насос TRI ROTAR V; колонка Finapak SIL C₁₈, 4,6 мм (внутр. диам.) x 25 см; объемная скорость 1,0 мл/мин; остальные условия те же.

Еще одна важная причина, стимулирующая переход аналитиков на полумикро-ВЭЖХ, - это высокая эффективность полумикроколонок. На рис. 7-39 показаны две хроматограммы одного и того же раствора, одна из которых получена на полумикроколоне с внутренним диаметром 1,5 мм, а вторая - на обычной колонке диаметром 4,6 мм. Если в обоих случаях насадочный материал один и тот же, то для переноса условий обычной ВЭЖХ непосредственно на полумикро-ВЭЖХ нужно,

чтобы полумикроколонка обладала такой же эффективностью, как обычная, и чтобы коэффициент емкости у обеих колонок был одинаков. В противном случае при переходе к работе на полумикроколоне оптимальные условия разделения придется находить заново. Для тех лабораторий, в которых ВЭЖХ используется как рутинный метод, это совершенно нежелательно.

В примере, представленном на рис. 7-39, использовалась неподвижная фаза для обращенно-фазовой хроматографии. Что касается других материалов, получивших распространение в качестве неподвижных фаз, таких, как силикагель, силикагель, модифицированный аминпропильными группами, и пористый полистирольный гель, то проведенные исследования подтвердили, что эффективность и коэффициент емкости полумикроколонок с внутренним диаметром 1,5 мм и обычной колонки для ВЭЖХ практически одинаковы.

7.3.2. Анализ фармацевтических и биохимических объектов

На рис. 7-40 показана хроматограмма, полученная при исследовании методом полумикро-ВЭЖХ противосудорожных средств. На полумикроколоне с внутренним диаметром 1,5 мм, заполненной силикагелем, модифицированным группами C₁₈, разделены фенобарбитал, фетинин и карбамазепин. Для этих препаратов характерен узкий эффективный интервал концентраций в крови и весьма разнообразный у различных индивидуумов спектр метаболитов. Кроме того, избыточные дозы этих лекарственных средств могут давать различные вредные побочные эффекты. Поэтому определение их концентрации в крови имеет исключительное значение для установления оптимальной дозы.

В работе Уайта и Лоуфера [28] описано разделение антибиотиков группы цефалоспоринов на колонке из нержавеющей стали с внутренним диаметром 1,0 мм, покрытой изнутри стеклом и заполненной силикагелем, модифицированным группами C₁₈. Таким способом были разделены пять антибиотиков данного класса (см. рис. 7-41). Этими же авторами проведено определение цефалоспоринов в ферментативных бульонах. Благодаря высокой чувствительности полумикро-ЖХ авторам удалось предварительную обработку пробы свести к простому ее разбавлению. Уайт и Лоуфер осуществили также определение примесей в антибиотиках класса цефалоспоринов с использованием метода градиентного элюирования.

Бейрам и сотр. [29] изучали разделение аминокислот методом полумикро-ВЭЖХ с УФ-детектором, позволяющим быстро изменять длину волны по дискретной циклической программе. На колонке 62 мм x 2 мм (внутр. диам.), заполненной

силикагелем, насыщенным амминным комплексом меди, они разделили 14 типов аминокислот. Эти же авторы описали определение мочевой кислоты в сыворотке крови (рис. 7-42).

7.3.3. Применение градиентного элюирования

Градиентное элюирование широко применяется в ВЭЖХ и в настоящее время является обычным аналитическим методом. Разработано два способа его осуществления: смешивание растворителей при низком давлении с последующей подачей смеси в колонку одним насосом и подача растворителей двумя насосами с последующим смешиванием их при высоком давлении. Первый способ получил в настоящее время большее распространение благодаря тому, что он дешевле и, кроме того, допускает добавление еще и третьего растворителя.

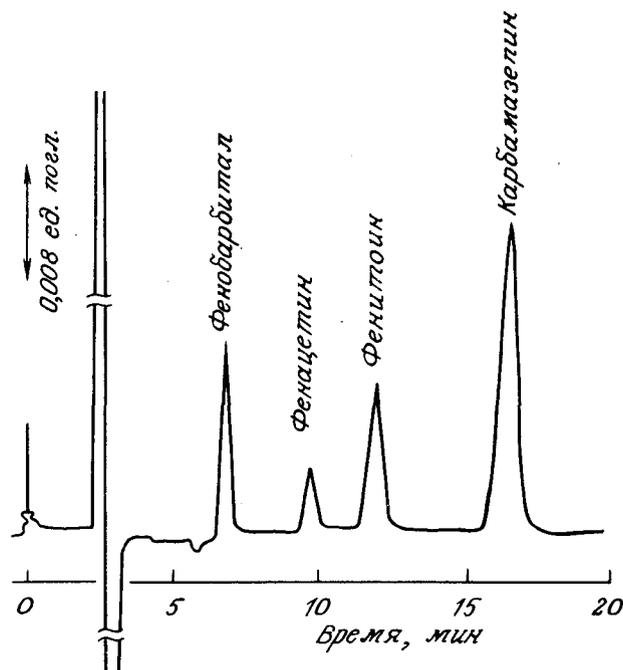


Рис. 7-40. Разделение антисудорожных средств. Колонка 1,5 мм (внутр. диам.) x 25 см, неподвижная фаза MS Фиперак SIL C₁₈; подвижная фаза ацетонитрил/водный раствор двузамещенного гидрофосфата калия (0,005 моль/л) (35/65); объемная скорость 150 мкл/мин; детектор УФ, 220 нм.

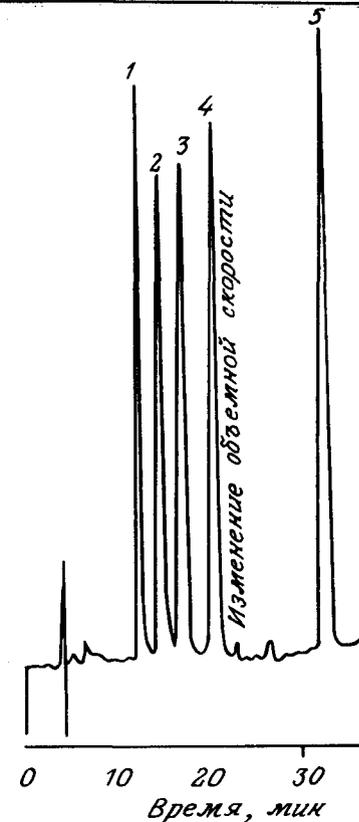


Рис. 7-41. Разделение смеси антибиотиков группы цефалоспоринов на капиллярной колонке. Колонка 1,0 мм (внутр. диам.) x 25 см; неподвижная фаза бондапак C₁₈ (10 мкм); подвижная фаза водный раствор дигидрофосфата натрия (0,01 моль/л)/метанол (75/25); объемная скорость 50 мкл/мин (начальная) и 150 мкл/мин (через 23 мин после начала разделения); объем пробы 5 мкл.

Пики: 1 - цефалексин (0,05 мкг), 2 - цефокситин (0,05 мкг), 3 - цефрандин (0,07 мкг), 4 - цефалоглицин (0,10 мкг), 5 - цефалотин (0,24 мкг).

В микро-ВЭЖХ градиентное элюирование до сих пор применялось очень редко, поскольку чрезвычайно трудно сконструировать достаточно миниатюрную градиентную установку. Что касается полумикро-ВЭЖХ, то Такахаша и сотр. [30] разработали простое устройство, позволяющее осуществить градиентное элюирование при помощи одного насоса даже при скоростях подачи элюента порядка нескольких десятых микролитра в минуту.

На рис. 7-43 приведена блок-схема этого градиентного устройства. Оно состоит из трехходового крана-переключателя и снабженной магнитной мешалкой смесительной камеры переменного объема, рассчитанной на высокое давление. Вначале всю систему (включая смесительную камеру и колонку) промывают исходным растворителем. Далее переключают трехходовой кран, и конечный растворитель начинает поступать через смесительную камеру в колонку. В результате состав сме-

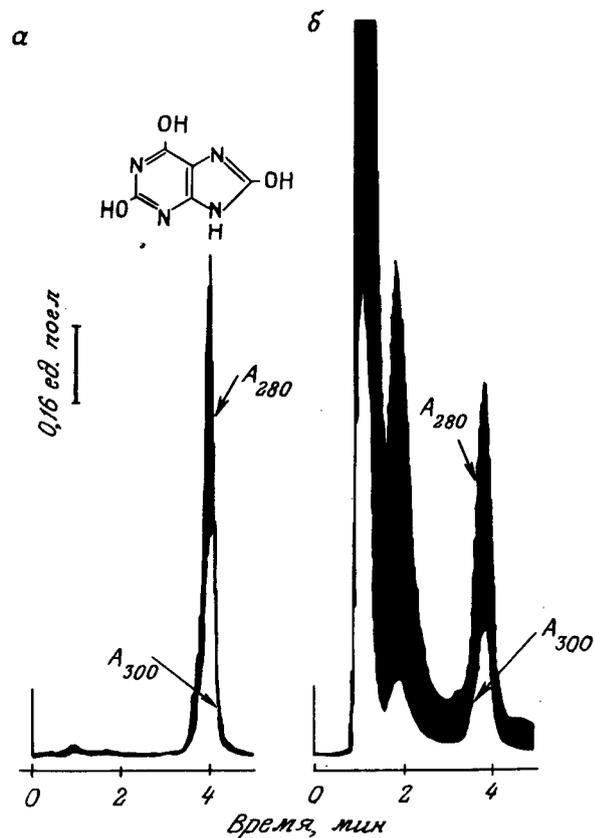


Рис. 7-42. Прямое определение мочевой кислоты в сыворотке крови человека методом обращенно-фазовой хроматографии. Колонка 2 мм (внутр. диам.) x 62 мм; неподвижная фаза нуклеосил C_{18} (5 мкм); подвижная фаза метанол/уксусная кислота (0,01 моль/л) (4/96); объемная скорость 100 мкл/мин; детектор УФ, 280 и 300 нм. *а* - хроматограмма стандартного раствора (5 мкг мочевой кислоты в воде), *б* - хроматограмма 5 мкл сыворотки крови здорового человека.

шанного элюента, поступающего из смесительной камеры, изменяется экспоненциально до тех пор, пока исходный растворенного элюента, поступающего из смесительной камеры, изменяется экспоненциально до тех пор, пока исходный растворитель не будет полностью заменен конечным. Изменение состава элюента описывается уравнением

$$C_t = C_f - (C_f - C_i) \exp(-Ft/V_m) \quad (1)$$

где C_t - концентрация смешанного растворителя по прошествии времени t ; C_f - концентрация конечного растворителя; C_i - концентрация конечного растворителя; F - объемная скорость подвижной фазы; V_m - объем смесительной камеры; t - время. Параметры градиентного элюирования можно изменять путем соответствующего выбора концентраций исходного и конечного растворителя и объема смесительной камеры.

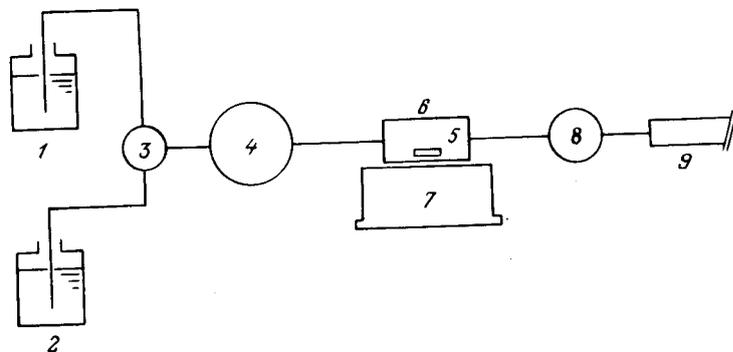


Рис. 7-43. Блок-схема системы градиентного элюирования для полумикро-ВЭЖХ.

1 - исходный элюент; 2 - конечный элюент; 3 - трехходовой кран-переключатель; 4 - насос; 5 - магнитный стержень, покрытый стеклом; 6 - резервуар; 7 - магнитная мешалка; 8 - дозатор; 9 - колонка.

На рис. 7-44 изображены кривые изменения состава элюента, полученные экспериментально, а также теоретическая кривая, рассчитанная по уравнению (1). На ординату нанесены величины поглощения при 260 нм (0,32 ед. погл. на всю шкалу). При снятии экспериментальных кривых исходным растворителем служил метанол, а конечным растворителем - раствор, содержащий 0,18% ацетона в метаноле. Смесительную камеру соединяли непосредственно с проточной кюветой УФ-детектора. Из рисунка видно, что изменение состава элюента при подаче его со скоростью 200 мкл/мин начинается через 3 мин, форма экспериментальной кривой хорошо согласуется с теоретической.

На рис. 7-45 показана типичная хроматограмма, полученная на описанной установке, а в табл. 7-2 приведены данные по воспроизводимости времен удерживания, которые показывают, что относительное стандартное отклонение восьми разных ароматических углеводов составляет менее 1%.

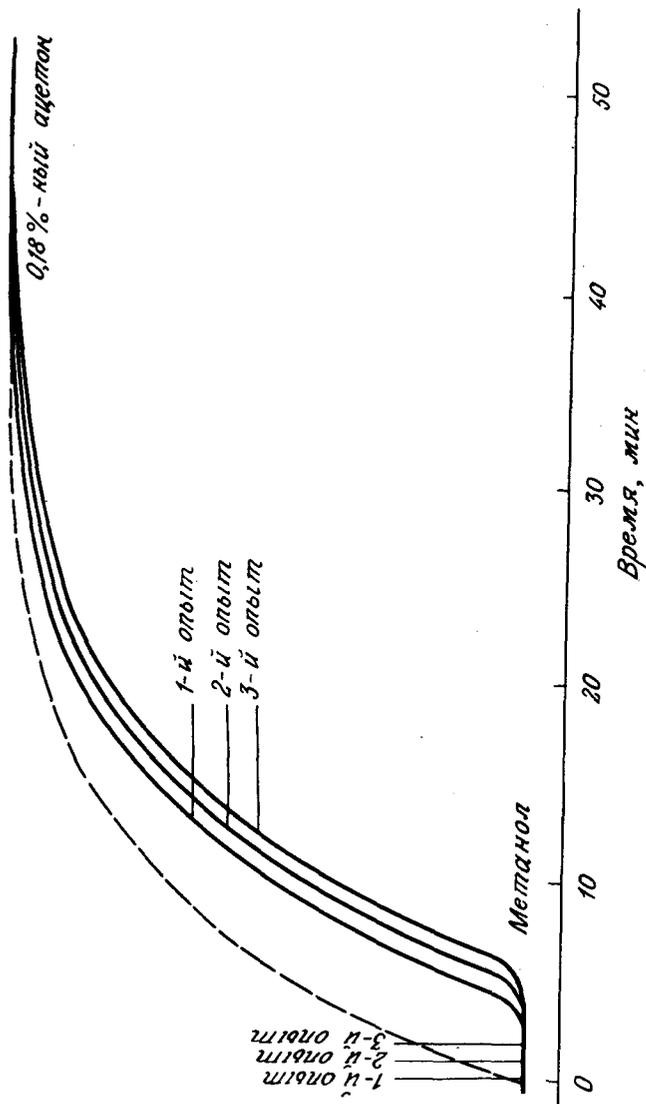


Рис. 7-44. Сравнение экспериментально полученных градиентных профилей с теоретическим. Растворитель А - метанол, растворитель В - 0,18%-ный раствор ацетона в метаноле (Б); резервуар трубка из нержавеющей стали 7,2 мм (внутр. диам.) x 50 мм; объемная скорость 200 мкл/мин; детектор УФ, 260 нм. Штриховая линия - теоретический градиентный профиль; сплошные линии - экспериментально полученные градиентные профили.

Таблица 7-2. Воспроизводимость времен удерживания при градиентном элюировании из полу-микроколонки

Номер пика ^а	Среднее время удерживания, мин ^б	Стандартное отклонение, мин	Относительное стандартное отклонение, %
1	9,36	0,084	
2	10,10	0,078	0,90
3	11,40	0,088	0,77
4	13,14	0,096	0,77
5	14,24	0,108	0,73
6	14,80	0,106	0,76
7	17,30	0,106	0,61
8	21,62	0,154	0,71

а - см. рис. 7-45; б - n = 6.

Рис. 7-45. Хроматограмма разделения многоядерных ароматических углеводородов с применением градиентного элюирования. Колонка 1,5 мм (внутр. диам.) x 250 мм; неподвижная фаза S Finapak SIL C₁₈; исходный элюент ацетонитрил/вода (50/50), конечный элюент ацетонитрил (100%); объемная скорость 150 мкл/мин; резервуар - трубка из нержавеющей стали 7,2 мм (внутр. диам.) x 50 мм.

Пики: 1 - нафталин, 2 - бифенил, 3 - флуорен, 4 - антрацен, 5 - пирен, 6 - трифенилен, 7 - хризен, 8 - бенз(а)пирен. Воспроизводимость анализа иллюстрируется табл. 7-2.

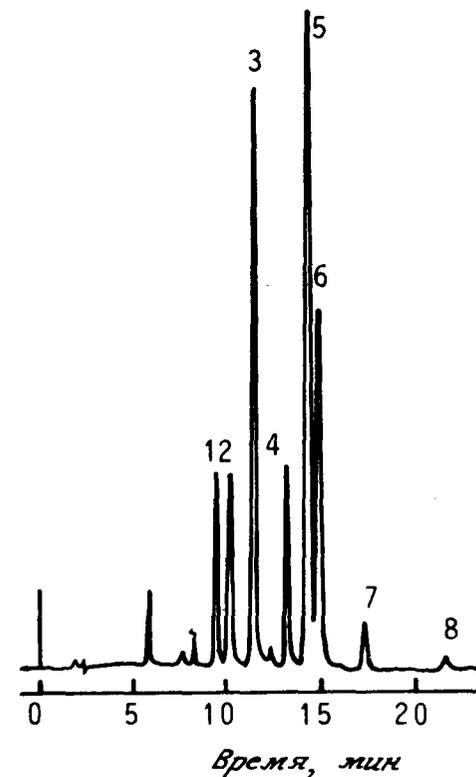


Рис. 7-46 - 7-48 иллюстрируют разделения различных смесей, полученные в режиме градиентного элюирования [31]. На рис. 7-46 представлена хроматограмма Каккопто - традиционного японского лекарственного средства, приготавливаемого из трав. Разделение проводилось на полумикроколонке внутренним диаметром 1,5 мм. В лекарственной траве содержится множество компонентов, и осуществить их полное разделение можно только методом ВЭЖХ с градиентным элюированием,

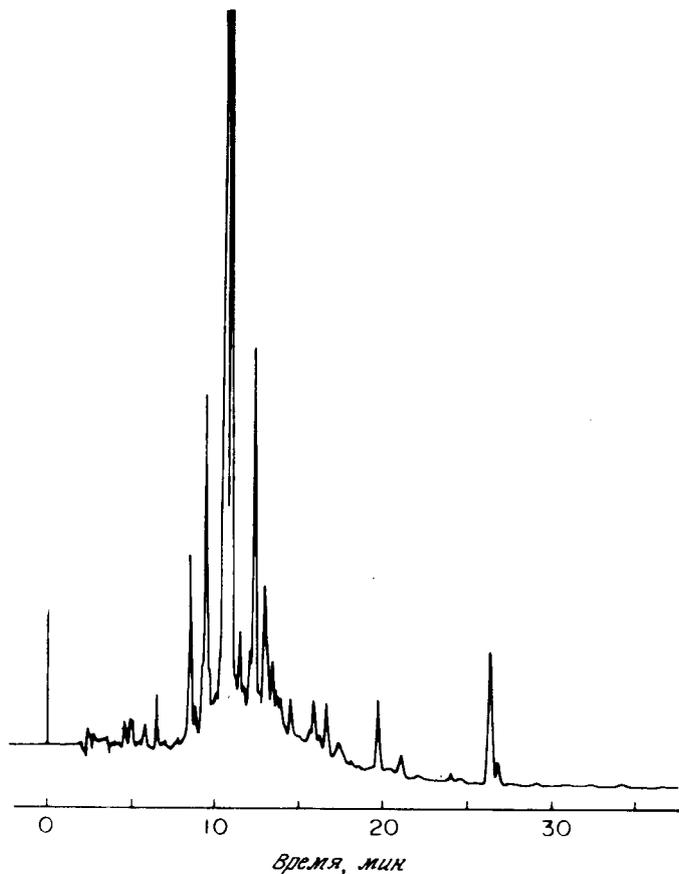


Рис. 7-46. Хроматограмма Каккопто - традиционного японского лекарственного средства, изготавливаемого из трав. Колонка 1,5 мм (внутр. диам.) x 250 мм; неподвижная фаза S Finapak SIL C18; исходный элюент 0,2%-ная фосфорная кислота, конечный элюент ацетонитрил/0,2%-ная фосфорная кислота (50/50); объем резервуара 1,77 мл; объемная скорость 150 мкл/мин; проба водный экстракт анализируемого препарата (экстракция проводилась при температуре воды 60°C); объем пробы 1,0 мкл; детектор УФ, 250 нм.

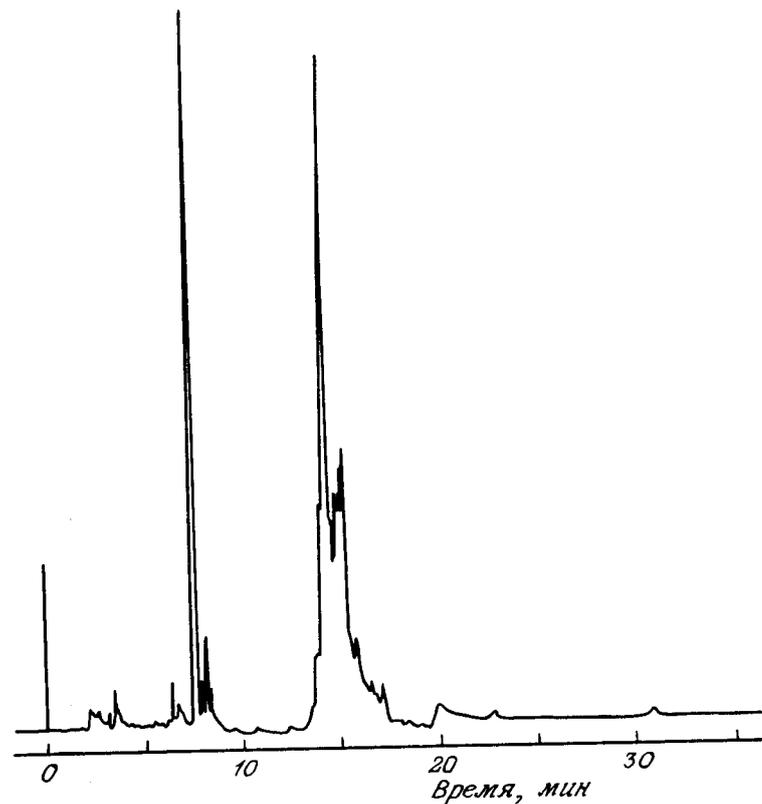


Рис. 7-47. Разделение компонентов сапонина. Колонка та же, что и на рис. 7-46; исходный элюент ацетонитрил/0,1%-ная фосфорная кислота (10/90), конечный элюент ацетонитрил/0,1%-ная фосфорная кислота (70/30); объемная скорость 150 мкл/мин; детектор УФ, 220 нм; проба водный раствор смеси, содержащей сапонин (10 мг/мл); объем пробы 1,0 мкл.

На рис. 7-47 изображена хроматограмма компонентов сапонина, применяемого в качестве отхаркивающего средства. И наконец, на рис. 7-48 представлена хроматограмма фенольной смолы. Обычно такого рода анализы проводят методом эксклюзионной хроматографии, однако, если необходима более детальная информация о низкомолекулярных компонентах, целесообразнее прибегнуть к обращенно-фазовому методу. Правда, при этом высокомолекулярные компоненты фенольной смолы сильно удерживаются колонкой, и для полного их удаления необходимо градиентное элюирование. В рассматриваемом эксперименте низкотемпературные компоненты смолы разделены с

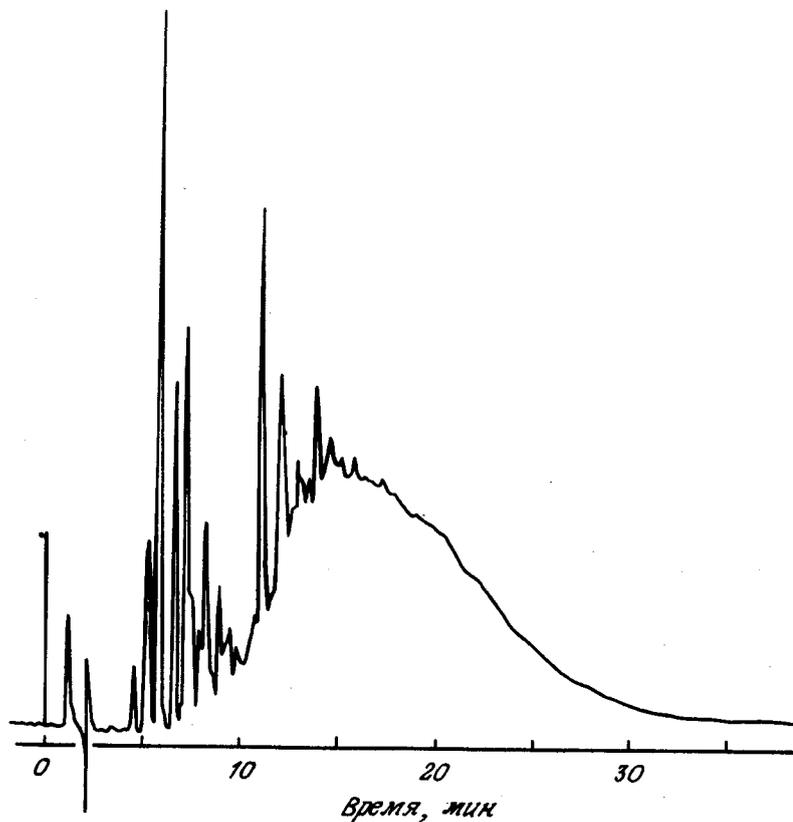


Рис. 7-48. Анализ фенольной смолы. Колонка та же, что и на рис. 7-46; исходный элюент ТГФ/дистиллированная вода (40/60), конечный элюент ТГФ/дистиллированная вода (80/20); детектор УФ, 280 нм; проба раствор фенольной смолы в ТГФ (24 мг/мл); объем пробы 1,0 мкл.

высокой эффективностью, а высокомолекулярная фракция элюировалась за приемлемое время.

Опубликовано несколько работ, посвященных методу градиентного элюирования со смешиванием при высоком давлении при помощи двух насосов [28, 32-35]. Скотт и Кучера [34] исследовали основные характеристики такой системы и описали ряд примеров ее применения. Так, на рис. 7-49 представлена хроматограмма, полученная при анализе проб сыворотки крови на длинной открытой капиллярной колонке внутренним диаметром 1 мм, изготовленной из нержавеющей стали. Шварц и сотр. [35] применили градиентное элюирование со смешивани-

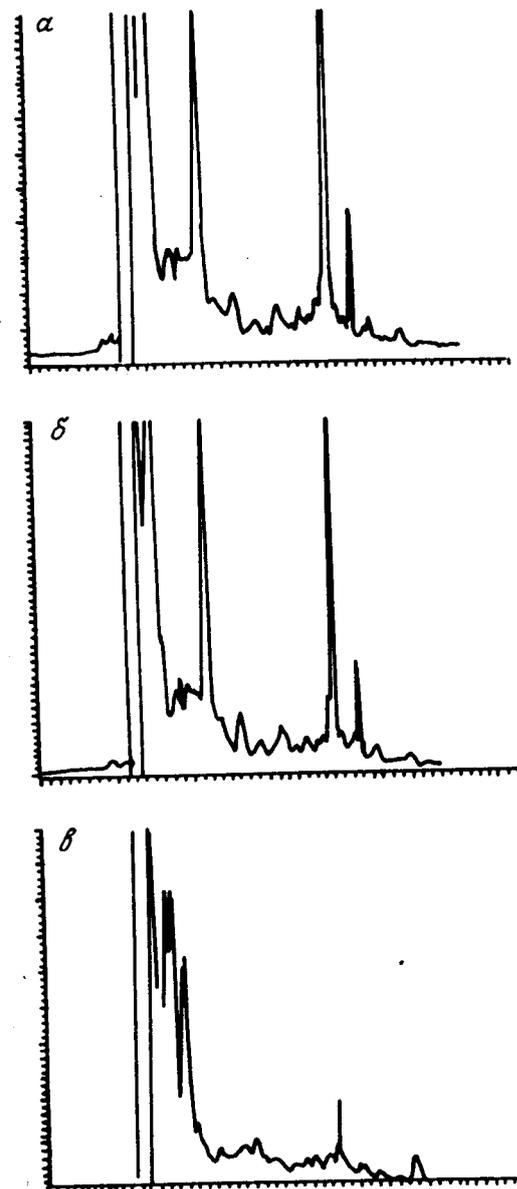


Рис. 7-49. Хроматограммы проб сыворотки крови, полученные при разделении на капиллярной колонке, на внутренние стенки которой нанесена неподвижная фаза. Колонка 1,0 мм (внутр. диам.) x 1 м; неподвижная фаза силикагель, модифицированный C18 (размер частиц 10 мкм); исходный элюент метанол/вода (75/25), конечный элюент 100%-ный метанол, экспоненциальный градиент (кривая No.9 программатора состава растворителя фирмы Waters); объемная скорость 40 мкл/мин; детектор УФ, 254 нм.

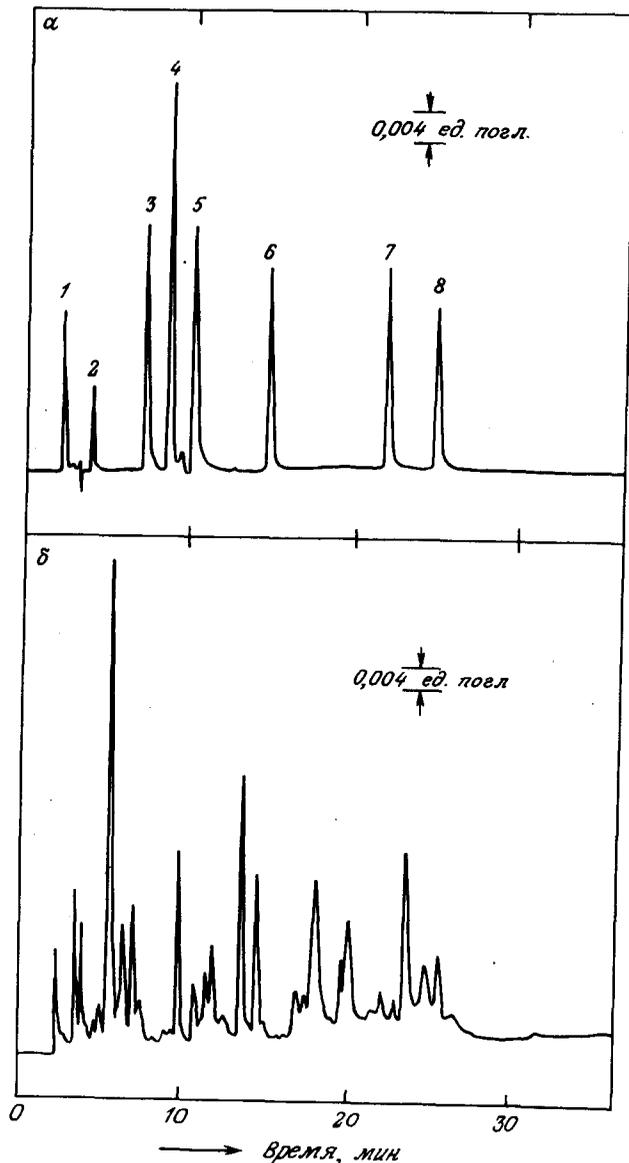


Рис. 7-50. *a* - разделение смеси пептидов на капиллярной колонке с применением градиентного элюирования. Колонка 1 мм (внутр. диам.) x 35 см; неподвижная фаза зорбакс ВР-ОДС (7,5 мкм); подвижная фаза ацетонитрил/водный раствор, содержащий 0,1% фосфорной кислоты и 10 ммоль/л дигидрофосфата калия (5/95); градиент 10 - 100% в течение 36 мин; объемная скорость 80 мкл/мин; детектор УФ, 214 нм; объем пробы 5 мкл.

ем под давлением для анализа пептидов и белков. На рис. 7-50 показаны две из полученных этими авторами хроматограмм. Смеси ряда пептидов и гидролизата инсулина разделяли на микроколонке 35 см x 1 мм (внутр. диам.).

7.3.4. Сочетание полумикро-ВЭЖХ и масс-спектрометрии

Мы подробно исследовали возможность сочетания полумикро-ВЭЖХ и масс-спектрометрии (МС). Обычно в полумикро-ВЭЖХ используются колонки внутренним диаметром 1,5 мм при объемной скорости порядка 100 мкл/мин. При сочетании полумикро-ВЭЖХ и МС поступающий из колонки элюат обычно делится в отношении 70:30 - 90:10 и 30 - 10% элюата подается с помощью специального переходного устройства в масс-спектрометр. Авторы настоящей главы использовали для подключения колонки вакуумный распылитель, разработанный Т. Цуге и описанный ранее в гл. 5 (разд. 5.2.).

Рис. 7-51. Масс-фрагментограмма компонентов, содержащихся в коммерческом лекарственном препарате. Колонка 1,5 мм (внутр. диам.) x 25 см; неподвижная фаза μ S Finerak SIL C₁₈ (10 мкм); подвижная фаза метанол/вода (90/10); объемная скорость 70 мкл/мин; детектор MS-100, многоканальное селективное детектирование.

Пики: 1 - ацетаминофен, $[M+H]^+$; 2 - эфензамид, $[M+H]^+$; 3 - аллилпропилацетилмочевина, $[M+H]^+$; 4 - кофеин, $[M+H]^+$.

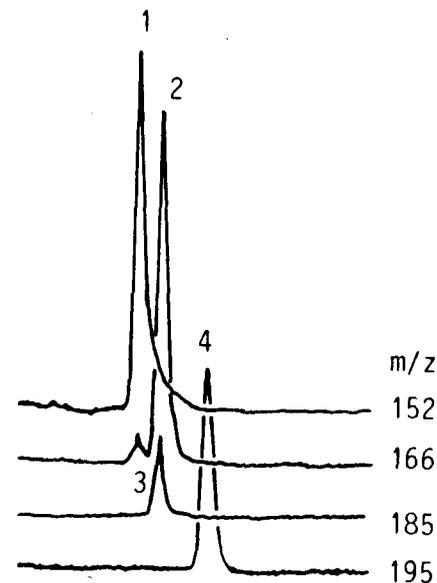


Рис. 7-50 (продолжение). *a*: Пики: 1 - GlySer, 2 - AlaVal, 3 - PheGly, 4 - TyrTyr, 5 - AlaPhe, 6 - ValAlaAlaPhe, 7 - GlyPhePhe, 8 - TrpTrp.

b - разделение компонентов гидролизата инсулина с применением градиентного элюирования. Подвижная фаза ацетонитрил/водный раствор, содержащий 0,1% фосфорной кислоты и 10 ммоль/л дигидрофосфата калия (50/50); объем пробы 50 мкл. Остальные условия те же, что и в случае *a*.

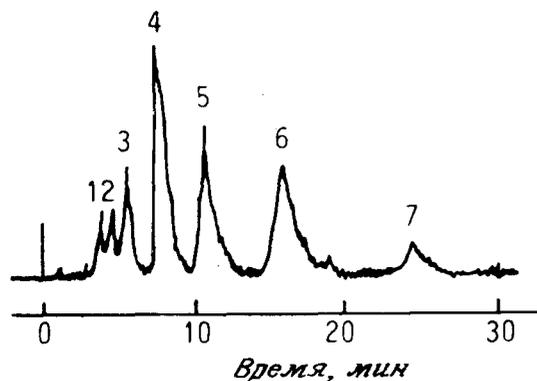


Рис. 7-52. Определение жирных кислот в экстракте омыленного пальмового масла. Колонка та же, что и на рис. 7-51; подвижная фаза метанол/вода (90/10); объемная скорость 80 мкл/мин; детектор мS-100, детектирование по суммарному ионному току.

Пики: 1 - капроновая кислота, 2 - каприловая кислота, 3 - каприновая кислота, 4 - лауриновая кислота, 5 - миристиновая кислота, 6 - пальмитиновая кислота, 7 - стеариновая кислота.

На рис. 7-51 изображены масс-спектрограммы имеющегося в продаже лекарственного средства, которые показывают, что с помощью метода ВЭЖХ-МС даже в неразделенном пике посредством многоканального селективного детектирования можно обнаружить несколько компонентов.

На рис. 7-52 показана хроматограмма жирных кислот, содержащихся в продуктах омыления пальмового масла. Масло нагревали в течение часа при 50°C в 1 н. метанольном растворе гидроксида калия. Выделившиеся при этом жирные кислоты экстрагировали хлороформом, экстракт выпаривали досуха, остаток растворяли в метаноле и полученный раствор анализировали методом полумикро-ВЭЖХ-МС. Детектирование проводилось по суммарному ионному току. Для идентификации разделенных соединений в максимуме каждого пика снижался масс-спектр (см. рис. 7-53).

7.3.5. Другие интересные примеры использования полумикро-ВЭЖХ

В литературе описано много других, помимо рассмотренных выше, примеров применения полумикро-ВЭЖХ. Кучера и сотр. [36] описали разделение ряда смесей, трудно разделяемых с помощью обычной ВЭЖХ. Рис. 7-54 демонстрирует полное разделение бензола и гексадейтеробензола на колонке 4,5 м x 1 мм (внутр. диам.), заполненной силикагелем, модифицированным привитыми группами C18. Следует отметить, что продолжительность разделения составляла 600 мин.

Джин и Раппапорт [37] определяли нитрозамещенные многоядерные ароматические углеводороды в саже дизельного

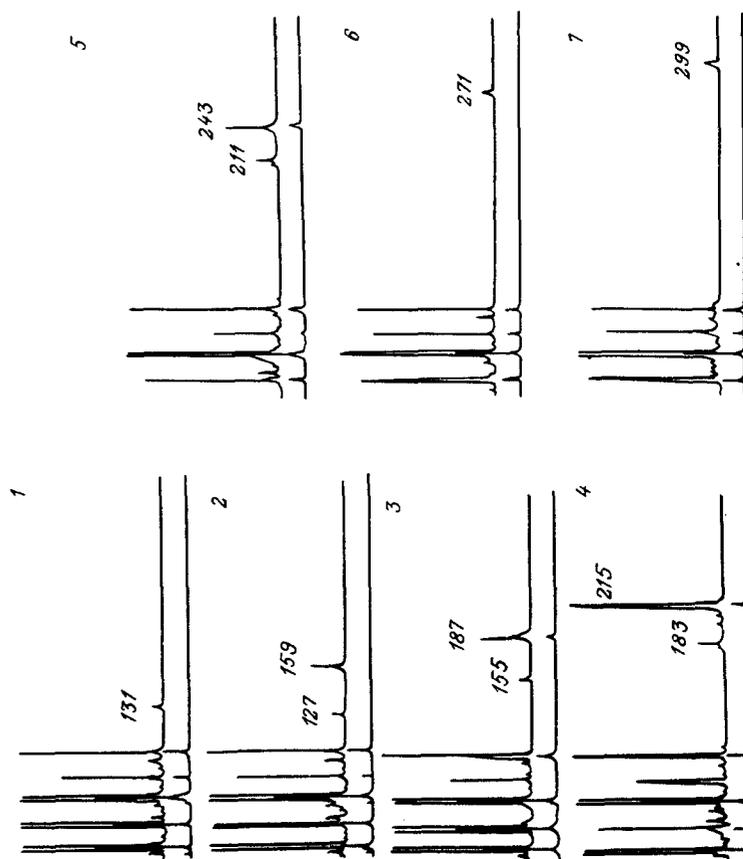


Рис. 7-53. Масс-спектры, снятые в максимумных пиках компонентов хроматограммы, изображенной на рис. 7-52. Результат идентификации по масс-спектрам: 1 - капроновая кислота, 2 - каприловая кислота, 3 - каприновая кислота, 4 - лауриновая кислота, 5 - миристиновая кислота, 6 - пальмитиновая кислота, 7 - стеариновая кислота.

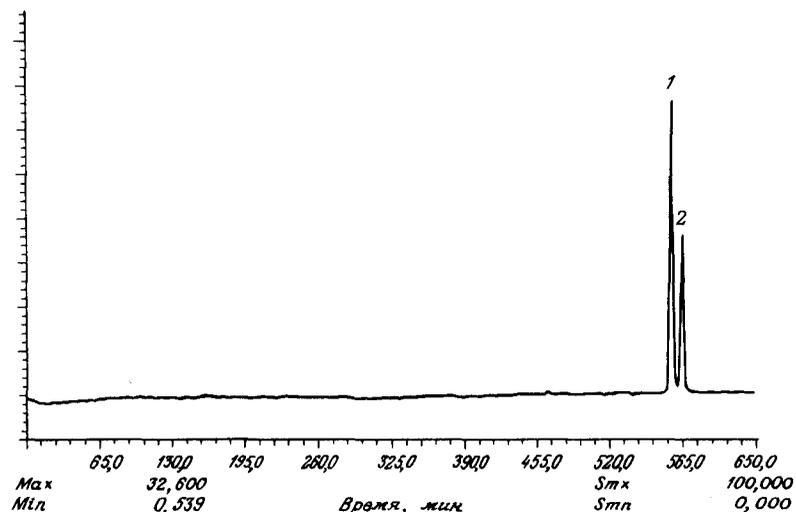


Рис. 7-54. Хроматограмма смеси бензола и гексадейтеробензола. Колонка 1 мм (внутр. диам.) x 4,5 м; неподвижная фаза зорбакс ODS (8 мкм); подвижная фаза метанол/вода (85/15); объемная скорость 10 мкл/мин; детектор УФ, 254 нм; объем пробы 0,5 мкл. Пики: 1 - гексадейтеробензол, 2 - бензол.

топлива методом микро-ЖХ с электрохимическим детектированием.

Наконец, в работе [38] описано разделение методом полумикро-ВЭЖХ оптических изомеров. На рис. 7-55 представлена хроматограмма D- и L-бинафтолов на колонке с хиральной (оптически активной) фазой. Используемая в этой работе насадка, разработанная Окамото и сотрудниками, представляет собой силикагель с нанесенным на него оптически активным соединением - политрифенилэтилметакрилатом. Обычно степень разделения оптических изомеров зависит исключительно от свойств насадки колонки, и ее нельзя улучшить, изменяя состав подвижной фазы. В связи с этим очень важно, что в полумикро-ВЭЖХ разделение можно проводить на длинных колонках, обладающих высокой эффективностью.

7.4. ВЫСОКОСКОРОСТНАЯ ВЭЖХ

7.4.1. Введение

Высокоскоростная ВЭЖХ позволяет выполнить анализ в несколько раз быстрее, чем обычная ВЭЖХ. Это обстоятельство имеет важное значение для тех лабораторий, в которых

ВЭЖХ используется как рутинный метод. Продолжительность анализа в ВЭЖХ можно уменьшить, увеличивая скорость подачи элюента или уменьшая длину колонки. Однако оба этих способа не приемлемы, если они приводят к удорожанию анализа или ухудшению разделения. Самая важная задача высокоскоростной ВЭЖХ заключается в том, чтобы сократить продолжительность анализа без ухудшения разделения. Необходимо заранее решить, до какой степени желательно уменьшить продолжительность анализа. При этом следует учесть возможности ускорения работы всех вспомогательных узлов прибора (например, автоматического дозатора и электронного блока обработки данных), а также то время, которое потребуется на ручные операции, например подготовку проб и оценку полученных результатов. С практической точки зрения желательно, чтобы анализ занимал не более 1 - 3 мин, т. е. примерно в 10 раз меньше, чем в среднем требуется для разделения методом обычной ВЭЖХ.

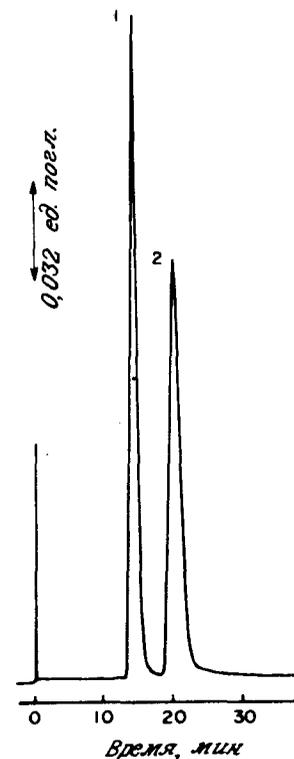


Рис. 7-55. Хроматограмма оптических изомеров D- и L-бинафтола. Колонка 1,5 мм (внутр. диам.) x 250 мм; неподвижная фаза μ S-хиралпак OT(+); подвижная фаза метанол; объемная скорость 40 мкл/мин; детектор УФ, 265 нм.

Пики: 1 - D-бинафтол, 2 - L-бинафтол.

7.4.2. Условия осуществления высокоскоростной ВЭЖХ.

Чтобы осуществить высокоскоростное и высокоэффективное разделение методом ЖХ, следует учесть все факторы, влияющие на продолжительность и эффективность разделения. В число таковых входят размеры колонки (ее длина и внутренний диаметр), объемная скорость подвижной фазы, постоянная времени детектора и внеколоночное размывание хроматографических полос. Продолжительность анализа зависит прежде всего от размеров колонки и объемной скорости подвижной фазы. Взаимосвязь между этими факторами иллюстрируется рис. 7-56. Как следует из этого рисунка, чтобы время анализа, проводимого методом обычной ВЭЖХ, снизилось в 10 раз, размеры колонки и объемная скорость должны соответствовать заштрихованной области. При этом необходимо учитывать пе-

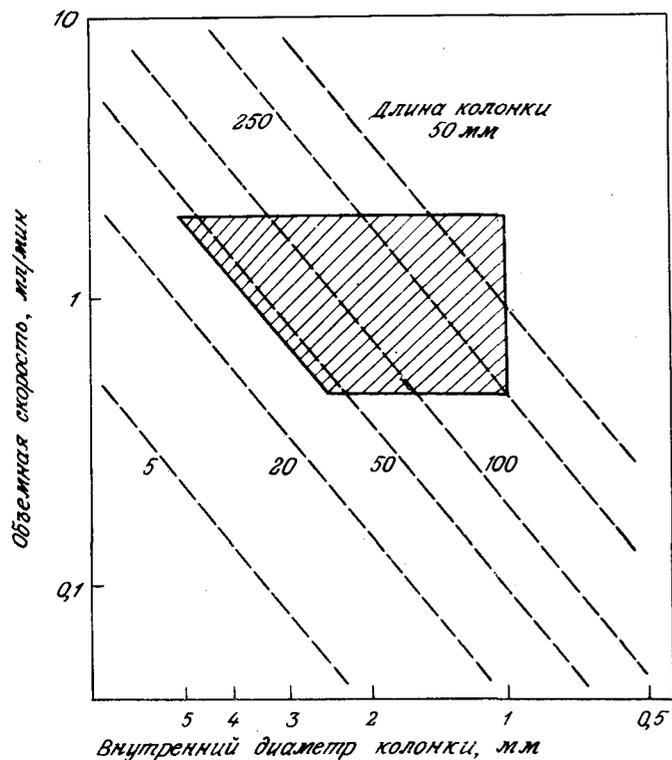


Рис. 7-56. Взаимосвязь объема колонки и объемной скорости подвижной фазы в высокоскоростной ВЭЖХ.

репад давления на колонке, размеры частиц предполагаемых насадочных материалов, требуемую эффективность разделения и допустимый расход растворителей.

Для высокоскоростной ВЭЖХ необходим детектор с малой постоянной времени, поскольку каждый компонент элюируется чрезвычайно быстро. Рис. 7-57 показывает взаимосвязь между линейной скоростью подвижной фазы и эффективностью разделения при различных постоянных времени детектора. При слишком большой постоянной времени (1,0 с) эффективность разделения при высоких линейных скоростях подвижной фазы, применяемых в высокоскоростной ВЭЖХ, уменьшается. Напротив, при достаточно малой постоянной времени детектора (0,25 с) эффективность заметно не уменьшается даже при больших линейных скоростях подвижной фазы. Из рисунка ясно, что для высокоскоростной ВЭЖХ необходим детектор с постоянной времени, не превышающей 0,25 с. Рис. 7-58 иллюстрирует влияние постоянной времени детектора на разделение пиков на реальной хроматограмме.

Из системы для высокоскоростной ВЭЖХ необходимо также устранить все источники внеколоночного размывания пиков, поскольку дисперсии полос разделенных компонентов очень малы вследствие малой длины колонки и малых размеров частиц насадки. Рис. 7-59 иллюстрирует влияние внеколо-

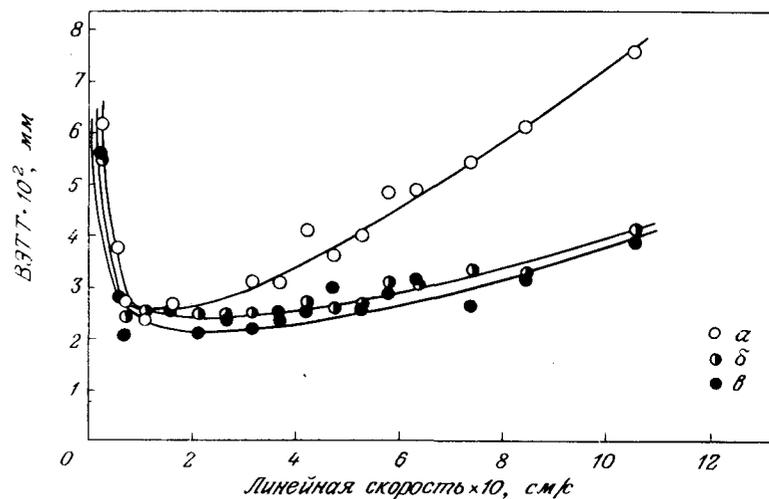


Рис. 7-57. Влияние постоянной времени детектора на эффективность разделения. Колонка 2,1 мм (внутр. диам.) × 100 мм; неподвижная фаза Fine SIL C₁₈ (5 мкм); проба нафталин ($k' = 3,5$). Постоянная времени детектора 1,0 (а), 0,25 (б) и 0,1 с (в).

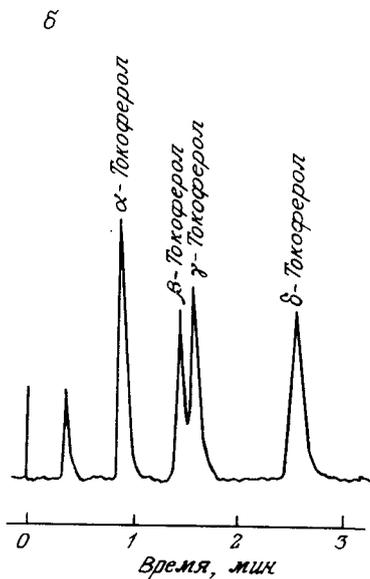
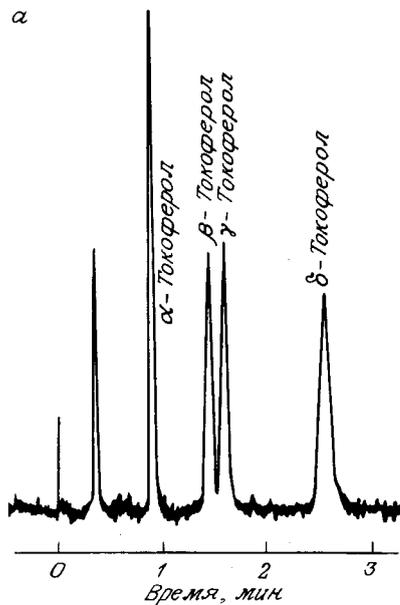


Рис. 7-58. Влияние постоянной времени детектора на эффективность разделения. *a* - малая постоянная времени (0,2 с); *б* - большая постоянная времени (2,0 с). Колонка 4,6 мм (внутр. диам.) x 50 мм; неподвижная фаза силикагель F-Finapak SIL (3 мкм); подвижная фаза *n*-гексан/изопропанол/уксусная кислота (100/0,5/0,5); объемная скорость 2,0 мл/мин; детектор флуоресцентный, длина волны возбуждающего излучения 295 нм, испускаемого излучения 325 нм; объем проточной ячейки 6,5 мкл; проба α -, β -, γ - и δ -токоферолы, объем пробы 3 мкл.

ночного размывания в дозаторе, соединительных трубках и проточной кювете на эффективность разделения при высокоскоростной ВЭЖХ на колонке 50 мм x 4,6 мм (внутр. диам.). Из рисунка очевидно, что достижение высокой эффективности в высокоскоростной ВЭЖХ возможно только при надлежащей конструкции хроматографической системы.

На рис. 7-60 сравниваются хроматограммы изомеров винамина Е, полученные при их разделении методами обычной и высокоскоростной ВЭЖХ. Нетрудно заметить, что при почти одинаковой эффективности разделения продолжительность анализа во втором случае меньше примерно в 10 раз.

7.4.3. Анализ лекарственных и косметических средств

ВЭЖХ широко используется для контроля качества фармацевтических препаратов. При этом важную роль играет высокоскоростная ВЭЖХ.

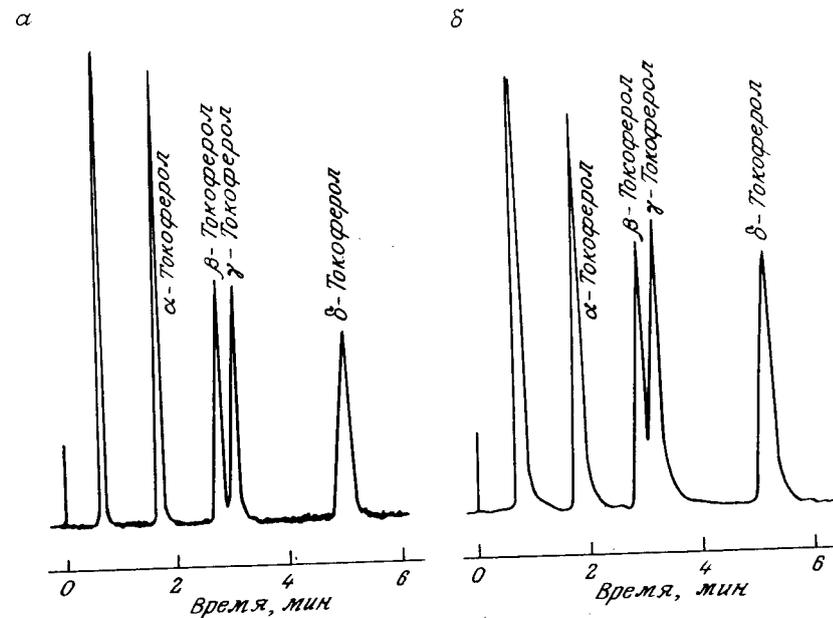


Рис. 7-59. Влияние внеколоночного уширения пиков на эффективность разделения. *a* - дозатор миниатюризированный с дозирующей петлей объемом 3 мкл, объем проточной кюветы 6,5 мкл, диаметр соединительной трубки 0,1 мм; *б* - дозатор обычный со сменной дозирующей петлей (объем вводимой пробы 3 мкл), объем проточной кюветы 15 мкл, диаметр соединительной трубки 0,25 мм. Объемная скорость в обоих случаях 1,0 мл/мин. Остальные условия те же, что и на рис. 7-58.

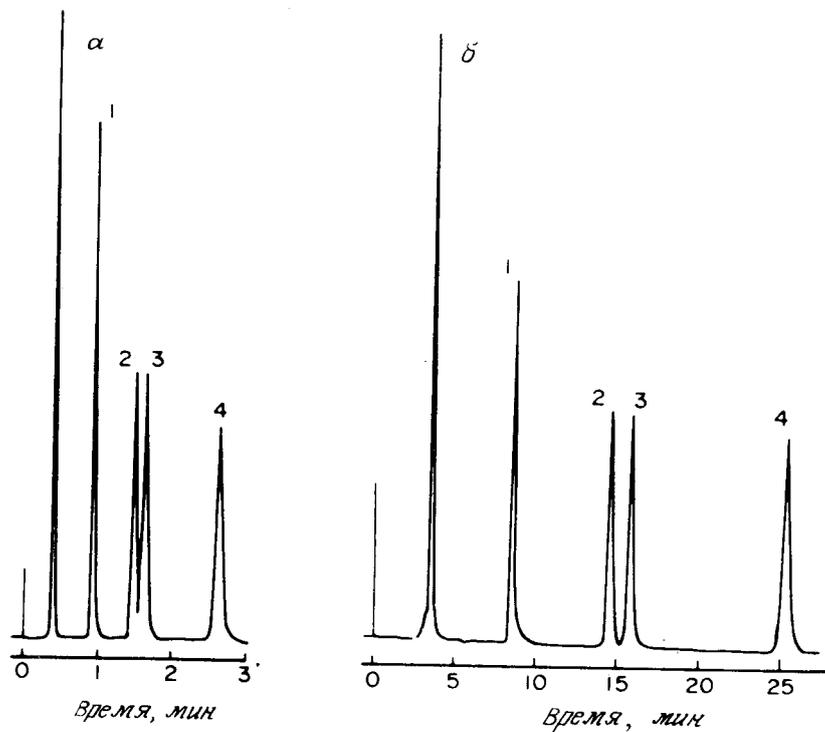


Рис. 7-60. Сравнение высокоскоростной (а) и обычной (б) ВЭЖХ.
 а - колонка 4,6 мм (внутр. диам.) x 50 мм; неподвижная фаза силикагель F-Fiperak SIL (3 мкм); подвижная фаза *n*-гексан/изопропанол/уксусная кислота (99/1/0,5); объемная скорость 2,0 мл/мин; детектор флуоресцентный; объем проточной кюветы 6,5 мкл; длина волны возбуждающего излучения 285 нм, флуоресцентного излучения 340 нм; постоянная времени детектора 0,2 с.
 б - колонка 4,6 мм (внутр. диам.) x 25 см; неподвижная фаза силикагель Fiperak SIL (5 мкм); объемная скорость 1,0 мл/мин; постоянная времени детектора 2,0 с; остальные условия опыта те же, что и при высокоскоростной ВЭЖХ. Пики: 1 - α -токоферол, 2 - β -токоферол, 3 - γ -токоферол, 4 - δ -токоферол.

На рис. 7-61 и 7-62 показаны хроматограммы, полученные при анализе различных коммерческих лекарственных препаратов на колонках, заполненных силикагелем с привитыми октадецильными группами с размером частиц 5 мкм.

В рассмотренных ранее примерах мы уже указывали на необходимость определения терапевтических концентраций различных лекарственных средств в сыворотке крови. Еще одним таким примером может служить хроматограмма, полученная

при определении методом высокоскоростной ВЭЖХ в сыворотке крови противосудорожных препаратов (рис. 7-63) [39].

Еще два примера представлены на рис. 7-64 и 7-65. На первом из них показано определение токоферолацетата в креме для кожи, а на втором - определение содержания изомеров токоферола в препарате витамина Е. В обоих случаях анализ осуществлялся посредством ВЭЖХ [39].

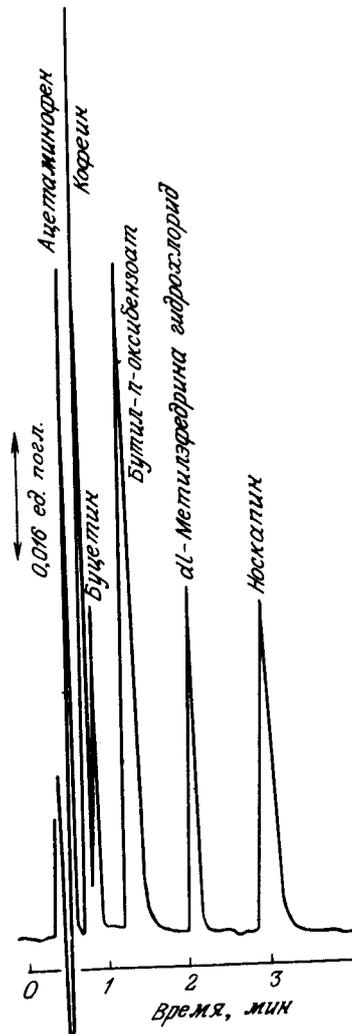


Рис. 7-61. Разделение компонентов лекарственного средства. Колонка 2,1 мм (внутр. диам.) x 10 см; неподвижная фаза Fine SIL C₁₈ (5 мкм) подвижная фаза ацетонитрил/раствор 1-пентилсульфоната (0,02 моль/л) (50/50); объемная скорость 0,7 мл/мин; детектор УФ, 215 нм; постоянная времени детектора 0,05 с.

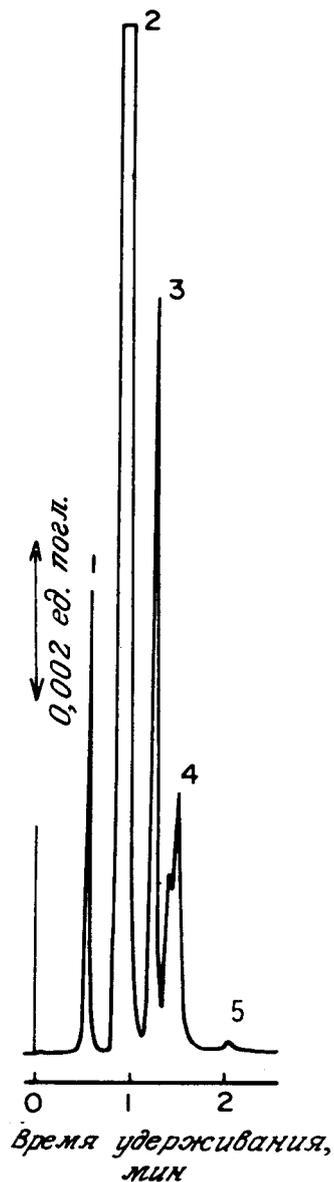


Рис. 7-62. Разделение компонентов лекарственного средства. Колонка 4,6 мм (внутр. диам.) x 5 см; неподвижная фаза F-Finapak SIL C₁₈ (3 мкм); подвижная фаза метанол/0,4%-ный раствор дигидрофосфата калия/0,4%-ный раствор 1-пентилсульфоната натрия (35/32,5/32,5); объемная скорость 1,0 мл/мин; детектор УФ, 260 нм; постоянная времени детектора 0,05 с. Проба экстракт лекарственного средства (экстракт подвижная фаза); объем пробы 2 мкл.

Пики: 1 - гваяколсульфонат калия, 2 - ацетаминофен, 3 - кофеин, 4 - рибофлавин, 5 - метилэфедрина гидрохлорид.

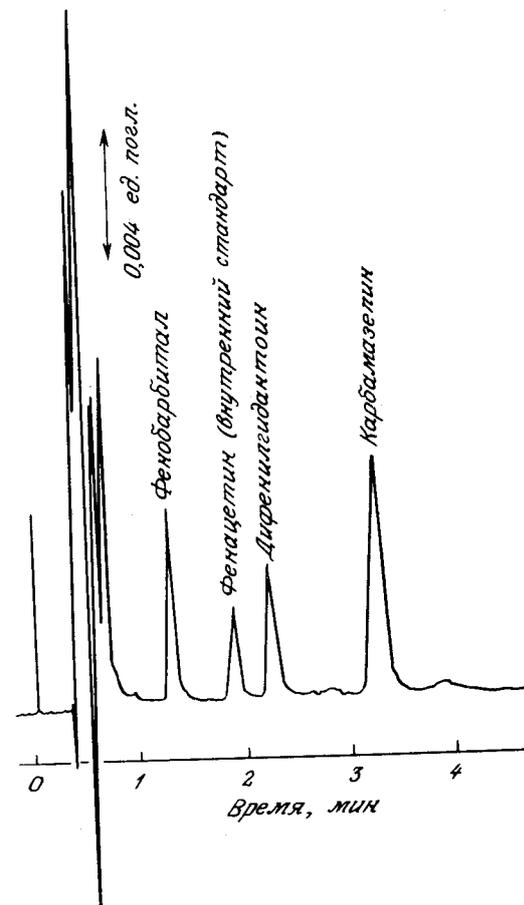


Рис. 7-63. Определение антисудорожных средств в сыворотке крови. Колонка 2,1 мм (внутр. диам.) x 10 см; неподвижная фаза Fine SIL C₁₈T (5 мкм); подвижная фаза ацетонитрил/водный раствор дигидрофосфата калия (5 ммоль/л, pH 3,0) (35/65); объемная скорость 0,7 мл/мин; детектор УФ, 220 нм; постоянная времени детектора 0,05 с.

7.4.4. Другие области применения высокоскоростной ВЭЖХ

В обычной ВЭЖХ для элюирования всех содержащихся в пробе компонентов требуется довольно много времени. Для ускорения анализа обычно прибегают к градиентному элюированию. Однако той же цели можно достигнуть и при изократическом элюировании, используя высокоскоростную ВЭЖХ. На

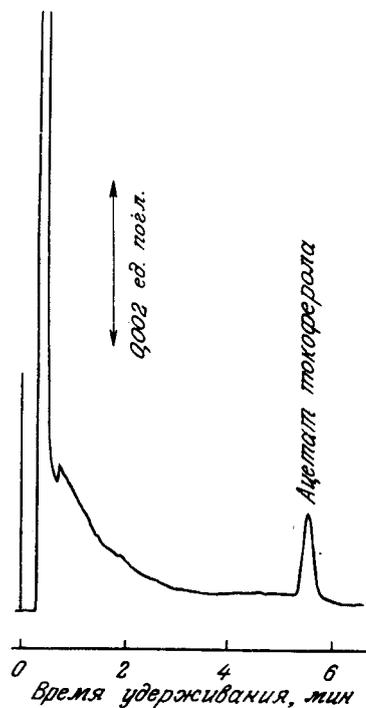


Рис. 7-64. Определение ацетата токоферола в косметическом креме. Колонка та же, что и на рис. 7-62; подвижная фаза ацетонитрил/0,2%-ная фосфорная кислота (99/1); объемная скорость 2,0 мл/мин; детектор УФ, 295 нм; постоянная времени детектора 0,05 с; проба этанольный экстракт косметического крема; объем пробы 10 мкл.

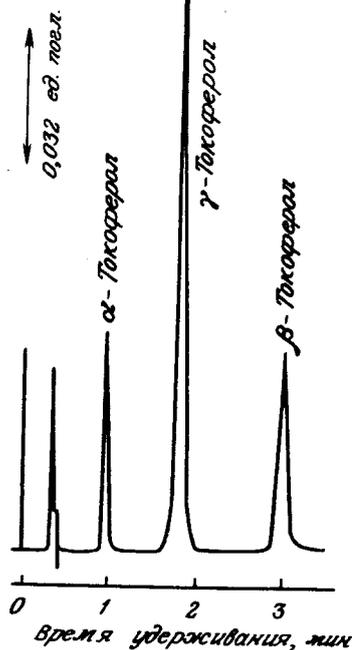


Рис. 7-65. Определение изомеров токоферола в капсуле витамина Е. Колонка та же, что и на рис. 7-60; подвижная фаза *n*-гексан/изопропанол/уксусная кислота (100/0,4/0,4); объемная скорость 1,0 мл/мин; детектор УФ, 295 нм; постоянная времени детектора 0,05 с; проба 2%-ный раствор содержимого капсулы в хлороформе; объем пробы 2 мкл.

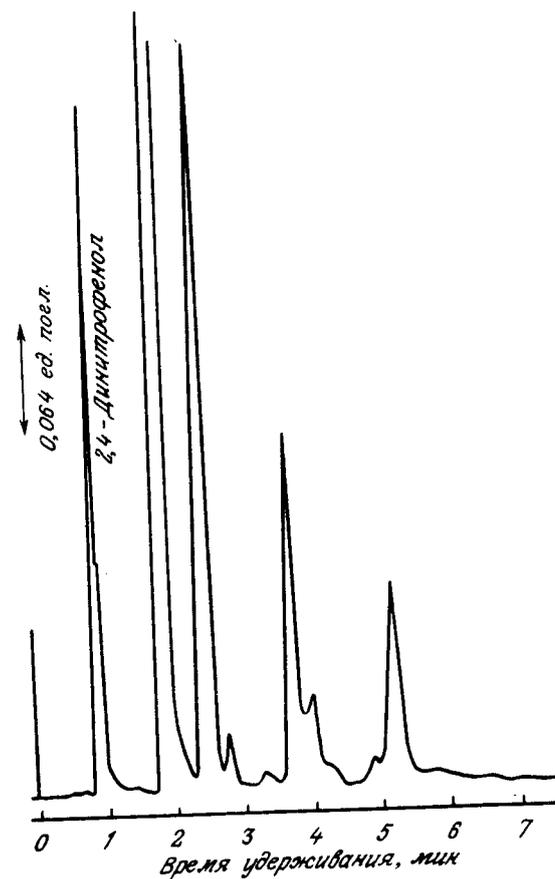


Рис. 7-66. Определение 2,4-динитрофенола в олигомерах полистирола. Колонка та же, что и на рис. 7-62; подвижная фаза ацетонитрил/0,2%-ная фосфорная кислота (7/30); объемная скорость 1,0 мл/мин; детектор УФ, 250 нм; постоянная времени детектора 0,05 с; объем пробы 5 мкл. Пики, элюировавшиеся после 2,4-динитрофенола, принадлежат полистирольным олигомерам.

рис. 7-66 показано определение 2,4-динитрофенола в смеси олигомеров полистирола методом высокоскоростной ВЭЖХ.

В высокоскоростной ВЭЖХ детектирование может проводиться электрохимическими детекторами. Так, Ди Буссола и сотр. [40] описали разделение фенолов, катахоламинов и ацетаминифена на колонках внутренним диаметром 4,6 мм и длиной 10 см и 3,3 см с последующим электрохимическим детектированием. [40]. Для проведения анализа требовалось всего 4 - 6 мин.

Для высокоскоростной ВЭЖХ пригодны и микроколонокки внутренним диаметром 1 - 1,5 мм. Например, Скотт и сотр. [41] разделили на такой колонке смесь семи компонентов всего за 30 с. Кучера [42] описал разделение четырех изомеров диазепамы и их метаболитов на колонке 25 см x 1 мм (внутр. диам.), которое также потребовало всего 30 с.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hara S., Yamauchi N., Nakae C., Sakai S. Anal. Chem., 1980, 52, 33.
2. Kimura Y., Kitamura H., Araki T. et al. J. Chromatogr., 1981, 206, 563.
3. Miyake K., Terada H. J. Chromatogr., 1978, 157, 386.
4. Okuyama S., Kokubun N., Higashidate S. et al. Chem. Lett., 1979, 1443.
5. Kamada S., Maeda M., Tsuji A. et al. J. Chromatogr., 1982, 239, 773.
6. Takeuchi T., Saito S., Ishii D. J. Chromatogr., 1983, 258, 125.
7. Ishii D., Murata S., Takeuchi T. J. Chromatogr., 1983, 282, 569.
8. Takeuchi T., Ishii D. J. High Res. Chromat. Chromat. Commun., 1983, 6, 571.
9. Takeuchi T., Yamazaki M., Ishii D. J. Chromatogr., 1984, 295, 333.
10. Takeuchi T., Ishii D., More S. J. Chromatogr., 1983, 257, 327.
11. Ishii D., Takeuchi T. J. Chromatogr., 1983, 255, 349.
12. Takeuchi T., Ishii D. J. High Res. Chromat. Chromat. Commun., 1983, 6, 310.
13. Takeuchi T., Ishii D. J. Chromatogr., 1983, 279, 439.
14. Takeuchi T., Ishii D. J. Chromatogr., 1982, 253, 41.
15. Takeuchi T., Jin Y., Ishii D. J. Chromatogr., 1985, 321, 159.
16. Nakanishi A., Ishii D., Takeuchi T. J. Chromatogr., 1984, 291, 398.
17. Ishii D., Goto M., Takeuchi T. J. Chromatogr., 1984, 316, 441.
18. Takeuchi T., Ishii D. J. High Res. Chromat. Chromat. Commun., 1984, 7, 151.
19. Iwai A. National Toneyama Hospital, частное сообщение, 1981.
20. Morishita T. Faculty of Home Economics, Mukogawa Women's University, частное сообщение, 1980.
21. Hibi K., Kaneuchi H. In "LC-Family", Japan Spectr. Co., Ltd. Press: Tokyo, 1980; v. 15, pp. 14-15.
22. Ouano A.C. Ind. Eng. Chem. Fundamentals, 1972, 11, 268.
23. Takeuchi T., Watanabe Y., Matsuoka K., Ishii D. J. Chromatogr., 1981, 216, 153.
24. Takeuchi T., Ishii D. J. Chromatogr., 1982, 244, 23.
25. Klesper E., Corwin A.H., Turner D.A. J. Ogr. Chem., 1962, 27, 700.
26. Takeuchi T., Ishii D., Saito M., Hibi K. J. Chromatogr., 1984, 295, 323.
27. Yamazaki M., Ichinoki S., Igarashi R. Bunseki Kagaku, 1981, 30, 40.
28. White E.R., Laufer D.N. J. Chromatogr., 1984, 290, 187.
29. Baram G.I., Grachev M.A., Komarova N.I. et al. J. Chromatogr., 1983, 264, 69.
30. Takahashi M. Pittsburgh Conf. on Anal. Chem. and Appl. Spectr., Atlantic City, March 1983, 936.
31. Hibi K., Japan Spectroscopic Company, неопубликованные результаты, 1983.
32. Kucera P. J. Chromatogr., 1980, 198, 93.
33. Hayes M.J., Schwarz H.E., Vours P. et al. Anal. Chem., 1984, 56, 1229.
34. Scott R.P., Kucera P. J. Chromatogr., 1979, 185, 27.
35. Schwarz H.E., Karger B.L., Kucera P. Anal. Chem., 1983, 55, 1752.
36. Kucera P., Manius G. J. Chromatogr., 1981, 216, 9.
37. Jin Z., Rappaport S.M. Anal. Chem., 1983, 55, 1778.
38. Okamoto Y., Honda S., Okamoto I. et al. J. Am. Chem. Soc., 1981, 103, 6971.
39. Hibi K. In "LC-Family", Japan Spectr. Co., Ltd. Press: Tokyo, 1984, v. 19, p. 10.
40. Di Bussolo J.M., Dong M.W., Gant J.R. J. Chromatogr., 1982, 6, 2353.
41. Scott R.P.W., Kucera P., Munroe M. J. Chromatogr., 1979, 186, 475.
42. Kucera P. J. Chromatogr., 1980, 198, 93.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Списки материалов, используемых для заполнения насадочных полумикро- и микроколонок, а также обычных колонок для ВЭЖХ *

Приложение 1

Список фирм-изготовителей, приведенных в приложениях 2-10

- | | |
|------------------------------------|---|
| 1. Alltech | 25. Jasco |
| 2. Altex | 26. Johns-Manville |
| 3. Analabs | 27. Jones Chromatography, Inc. |
| 4. Anspec Company | 28. Laboratory Instrument Works
(Prague, Czechoslovakia) |
| 5. Applied Science | 29. Machery-Nagel (Germany) |
| 6. Beckman | 30. MCB |
| 7. Benson Company | 31. Perkin-Elmer |
| 8. Biolab Products | 32. Phase Sep |
| 9. BioRad Laboratories | 33. Pierce |
| 10. Brownlee | 34. Rainen |
| 11. Calbiochem-Behring Corporation | 35. Regis |
| 12. Chromanetics | 36. Rheodyne |
| 13. Chromatix | 37. Rhone Poulenc (France) |
| 14. Chrompak (Holland) | 38. RSL |
| 15. Dionex | 39. Separations Group |
| 16. DuPont | 40. Shandon |
| 17. ES Industries | 41. Supelco |
| 18. Gow Mac | 42. Synchron |
| 19. Hamilton | 43. Toyo Soda |
| 20. Hetp | 44. Unimetrics Corporation |
| 21. Hewlett-Packard | 45. Varian |
| 22. Hitachi | 46. Waters Associates |
| 23. HPLC Technology Ltd. | 47. Whatman |
| 24. OCN Igc. | |

*Займствовано из статьи Majors R.E., J. Chromatogr. Sci., 18, 488 (1980). Перепечатано с некоторыми изменениями с разрешения фирмы Preston Technical Abstracts Company.

Приложение 2

Тонкодисперсные насадки для нормально-фазовой жидкостной хроматографии

Название	Изготовитель ^а	Средний диаметр частицы, мкм	Удельная поверхность, м ² /г	Средний диаметр пор, А	Описание и примечания
Кремнезем с частицами неправильной формы					
Хромосорб LC-6	1,41	5, 10	400	120	Плотность 0,41 г/мл.
Хитачи-гель серии 3030	22	5 - 7	500		
Силикагель фирмы ICN	24	3 - 7, 7 - 12	500-600		
Лихросорб SI-60	2,5,10,12,13,23,27,36,41,44	5, 10	550	60	
Лихросорб SI-100	2,5,10,12,13,23,27,36,41,44	5, 10	300	100	
-Порасил	1,46	10	300-500		
Партисил	2,18,23,27,33,47	5, 10	400	60	Плотность 0,45 г/мл. Объем пор 0,75 мл/г.
Полигосил	14,23,29,34,38	5, 7, 10, 15	500	60	
R SiL	1,38	5, 10	550	60	
SiL-X-1	31	13 ± 5	400		С химически обработанной поверхностью
Кремнезем с частицами сферической формы					
Апекс Силика	27	5	200	100	Объем пор 0,7 мл/г.
Fine SiL	25	5	500	60	
Гиперсил	12,23,27	3, 5, 10	200	100	
Лихросфер Si-100	1,5,21,23,27,41	5, 10	250	100	Объем пор 1,2 мл/г. Незаполненный объем 1,06 мл/г. Выпускается с разным диаметром пор.
Нуклеосил Si-50	1,14,23,29,34,38,41	5, 7,5, 10	300, 500	50	Объем пор 0,8 мл/г.
Нуклеосил Si-100	1,14,23,29,38,41	5, 7,5, 10	300	100	Объем пор 1,0 мл/г.
Сепарон Si VSK	28	5, 7,5, 10	450	130	Объем пор 1,5 мл/г. Плотность набивки 0,6 мл/г.
Сферисорб SW	1,12,20,23,27,32,35,41	3, 5, 10	220	80	
Сферосил ХОА 600	3,37,41	5 - 7	600 ± 10%	80	Объем пор 0,7 - 1 мл/г.
Сферосил ХОА 800	3,37,41	5 - 7	860	40	Объем пор 0,4 - 0,6 мл/г.
TSK-гель Силика-60	43	5, 10	500	60	
TSK-гель Силика-150	43	5, 10	330	150	
Видак 101 TP	1,3-5,14,41	10	100	330	
Зорбакс BP-SiL	1,16,23,41	8	350	70-80	
Оксид алюминия					
Алокс 60-D	14,29,34,38	5, 10	60	60	Основной, pH 9,5.
Лихросорб Алокс Т	10,13,35,36	5, 10	70	150	
Сферисорб AT	23,32,35,41	5, 10	95	130	Предельное pH 10.

^а Список фирм-изготовителей приведен в Приложении 1.

Приложение 3

Тонкодисперсные насадочные материалы с привитой неподвижной фазой для нормально-фазовой хроматографии^а

Название	Изготовитель ^б	Функциональные группы	Средний диаметр частиц, мкм	Описание и примечания
Лихросорб диол	2,5,8,10,12,13, 21,23,27,36,44	Диол	10	Для разделения сильнополярных соединений
Нуклеосил OH	1,2,14,29,34,38	Спиртовые OH	7,5	Смачивается H ₂ O
TSK-гель OH-120	43	Спиртовые OH	5, 10	
Нуклеосил N(CH ₃) ₂	1,2,14,23, 29,34,38	Триалкиламин	5, 10	Является также слабым анионообменником
Полигосил 60-D-N(CH ₃) ₂	1,23	Триалкиламин	5, 10	Может использоваться как слабый анионообменник
Полигосил NO ₂	1,2,14,23,29, 34,38,41	Нитро	5, 10	Сферические частицы. Средство к двойной связи.
Полигосил NO ₂	1,23,29	Нитро	5, 10	Применяется для разделения ароматических соединений. Средство к двойной связи.
RSIL NO ₂	1,38	Нитро	5, 10	Покрытие 5% С

^а Слабополярные.
^б Список фирм-изготовителей приведен в Приложении 1

Приложение 4

Тонкодисперсные насадочные материалы с химически привитой CN-группой для нормально-фазовой хроматографии^а

Название	Изготовитель ^а	Функциональные группы	Средний диаметр частиц, мкм	Описание и примечания
Апекс циано	27	Циано-	5	Монослой.
Хромосорб LC-8	1,8,45	Циано-	5, 10	Диаметр пор 110 А. Плотность 0,43 г/мл.
Гиперсил CPS	23,41	Цианопропил-	3, 5, 10	Монослой. рН 3 - 8.
Лихросорб CN	5,10,13,23,30,36	Циано-	5, 10	Вначале поверхность обрабатывается толил-трихлорсиланом, а затем NBS с последующим нуклеофильным замещением галогена. Покрытие 9% масс.
М-Бондапак CN	1,46	Циано-	10	
Микропак CN	45	Цианопропил-	10	
Нуклеосил CN	1,2,14,29,34,38,41	Циано-	5,10	Покрытие 6 мкэкв/м ² .
Партисил-10 PAC	1,2,12,18,23,27,33,47	Циано-	10	Отношение NH ₂ :CN 2/1
Полигосил CN	1,23,29	Циано-	5,10	Покрытие 6 мкэкв/м ² .
RSIL CN	1,38	Цианопропил-	5, 10	Покрытие 5% С.
Сферисорб CN	1,2,12,20,23, 27,32,35,41	Циано-	5, 10	Диаметр пор 80 А. Покрытие 0,6 ммоль/г.
Видак 501 TP	1,3,4,5,14,39,41	Циано-	10	Сферические частицы.
Зорбакс BP-CN	8,16,23,41	Циано-	8	Монослой

^а Умеренно полярные.
^б Список фирм-изготовителей приведен в Приложении 1

Приложение 5

Тонкодисперсные насадочные материалы с химически привитой аминогруппой для нормально-фазовой хроматографии^а

Название	Изготовитель ^а	Функциональные группы	Средний диаметр частиц, мкм	Описание и примечания
Апекс Амино	27	Амино-	5	
Гиперсил APS	23,32	Аминопропил-	3, 5, 10	
Хромосорб LC-9	26,41	Амино-	10	Плотность 0,48 г/мл. Сферические частицы.
Fine SIL NH ₂	25	Аминопропил-	5, 10	
Лихросорб NH ₂	1,2,5,8,13, 21,23,27,44	Амино-	10	
μ-Бондапак NH ₂	1,23,46	Амино-	10	pH 2 - 8. Покрытие 9% масс
Микропак NH ₂	45	Аминопропил-	10	
Нуклеосил NH ₂	1,2,14,23, 29,34,38,41	Амино-	5, 10	Слабоосновной. Для отделения полярных соединений.
Полигосил NH ₂	1,23,29	Амино-	5, 10	
RSIL NH ₂	1,38	Аминопропил-	5, 10	Поверхность сначала обрабатывают хлорпропилтрихлорсиланом, а затем NBS с последующим нуклеофильным замещением галогена. Покрытие 6%.
Сепарон SiNH ₂	28	Аминопропил-	5, 10	
Сферисорб NH ₂	1,12,20,23, 27,32,35,41	Аминопропил-	5,10	Диаметр пор 80 А. Покрытие 0,6 ммоль/г.
TSK-гель NH ₂ -60	43	Аминопропил-	5	
Зорбакс ВР-NH ₂	8,23,41	Амино-	8	Монослой.

^а Сильно полярные.

^б Список фирм-изготовителей приведен в Приложении 1

Приложение 6

Тонкодисперсные насадочные материалы с химически привитым октадецилсиланом для обращенно-фазовой хроматографии

Название	Изготовитель ^а	Средний диаметр частиц, мкм	Покрытие, %С	Описание и примечания
Апекс ODS	27	5	10	Проведен эндкепинг ^б .
Хромосорб LC-7	1,41	3, 5, 10	10	Монослой. Средний диаметр пор 100 А.
Fine SIL C ₁₈	25	5, 10	14	
Fine SILC C ₁₈ T	25	5, 10	14	Проведен эндкепинг ^б .
Хитачи гель серии 3050	22	5-7, 10-15		pH 2 - 8.
Лихросорб RP-18	1,5,10,12,13,21 23,27,36,41,44	5, 10	22	pH 1 - 9.
μ-бондапак C ₁₈	1,23,46	10	10	
Микропак CH ^а	45	10	22	Полимерный; проведен эндкепинг ^б .
Микропак MCH	45	5,10	12	Мономерный слой; с проведением эндкепинга и без.
Нуклеосил C ₁₈	1,14,23, 29,34,38	5, 7,5, 10	15-16	Коэффициент емкости в 2 раза больше, чем у C ₈ ; pH 1-9. Сферические частицы.
Гиперсил ODS	12,23,27,40	3, 5, 10	9	Проведен эндкепинг ^б .
ODS-SIL-X-1	31	13 ± 5		
Партисил ODS-1 ^Г	1,18,23,27,33,47	5, 10	5	Высокое содержание силанола.
Партисил-10 ODS-2	1,12,18, 23,33,47	10	15	Высокое удерживание и большая емкость. Рабочие температуры до 70°C.
Партисил-10 ODS-3	18,33,47	10	10	Проведен эндкепинг ^б .

Полигосил C18	1,14,23,24 29,34,38	3, 7,5, 10	11	Кoeffициент емкости в 2 раза больше, чем у C ₈ ; pH 1-9. Частицы неправильной формы.
RSIL C ₁₈ HL	1,38	5, 10	18	Проведен эндкепинг ^б .
RSIL C ₁₈ LL	1,38	5, 10	9	Проведен эндкепинг ^б .
Сепарон Si C ₁₈	28	5, 10	20	Проведен эндкепинг ^б .
Сферисорб ODS	1,12,20,23, 27,32,35,41	5, 10	7	Проведен эндкепинг ^б .
Сферосил C ₁₈	3,31,37,41	5 - 7	0,3 ммоль/г 20-23	Средний диаметр пор 80 А.
Техсфер C ₁₈	23	5, 10	10	Насадка с частицами неправильной формы называется Техсил C ₁₈ . Обе выпускаются с проведением эндкепинга и без.
TSK гель ODS 120A	43	5, 10		
TSK гель ODS 120T	43	5, 10		
Видак 201 C ₁₈	1,3,4,5, 14,39,41	5, 10	10 3,35 ммоль/м ²	Эндкепинг не проводится. pH 1-9.
Зорбакс BP-ODS	1,12,16,23,41	8	15	Монослой.

^а Список фирм-изготовителей приведен в приложении 1

^б Эндкепинг - дополнительная обработка насадочного материала после прививки углеводородных групп с целью устранения оставшихся на поверхности гидроксильных групп.

^в Рекомендуется для неполярных соединений; ^г для более полярных соединений.

Приложение 7

Тонкодисперсные насадочные материалы с химически привитым октилсианом для обращенно-фазовой хроматографии

Название	Изготовитель ^а	Средний диаметр частиц, мкм	Покрытие, % С	Описание и примечания
Апекс C ₈	27	5	5	Выпускается с проведением эндкепинга.
Fine SIL C ₈ Лихросорб RP-8	25 1,5,10,12, 13,21,23,27, 6,41,44	5, 10 5, 10	13 - 14	Рекомендуется для веществ с умеренной полярностью. Монослой.
Гиперсил MOS Нуклеосил C ₁₈ Полигосил C ₈	12,23,40 1,14,23,29,34,38,41 14,23,29,36,38	3, 5, 10 5, 7,5, 10 5, 7,5, 10	10 - 11 10 - 11	pH 1-9. pH 1-9. Сферические частицы.
Техсфер C ₈	23	5, 10	10	Насадка с частицами неправильной формы называется техсил C ₈ .
Зорбакс BP-C ₈	12,16,23,41	8	15	Монослой.

^а Список фирм-изготовителей приведен в Приложении 1

Приложение 8

Прочие тонкодисперсные насадочные материалы для обращенно-фазовой хроматографии.

Название	Изготовитель ^а	Средний диаметр частиц, мкм	Покрытие, % С	Описание и примечания
Гексилсилан				
Хромегабонд	17	10	10	Монослой; средний диаметр пор 80 А. При изготовлении проводится эндкепинг
циклогексил	17	10	10	
Сферисорб С ₆	1,12,20,23,33,35,41	5±2	0,6 ммоль/г	
Метилсилан				
Алекс С ₂	27	5	3	Для полярных многофункциональных соединений
Fine SIL С ₁	25	5,10		Рекомендуется для полярных соединений Основная обработка поверхности хлорпропилтрихлорсиланом. Для эндкепинга используется триметилхлорсилан (ТМХС). Метилированная поверхность; пригоден для эксклюзионной хроматографии. Предел эксклюзии 50000.
Лихросорб RP-2	1,5,8,10,12,13,21,23,27,36,41,44	5,10		
RSIL С ₃	1,38	5,10		
Сепарон SiC ₁	28	5,10		
TSK гель TMS-250	43	5		Монослой
Зорбакс BP-TMS	12,16,23	8		
Фенилсилан				
Алекс фенил	27	5	5	Для аминов и гидроксилсодержащих соединений.
μ-Бондапак	1,23,46	10	10	Более полярный, чем С ₁₈ .
Нуклеосил фенил	1,14,29,34,38	7,5	10	Для очень малополярных соединений и жирных кислот.
RSIL фенил	1,38	5,10		Для неполярных соединений.
Сферисорб Р	1,12,23,32	5±2	0,3 ммоль/г	Средний диаметр пор 80А.
Сополимер стирола с дивинилбензолом				
Fine GEL 110	25	10		Пригоден для эксклюзионной хроматографии, предел эксклюзии 3000.
Fine GEL 101	25	8		
Хитачи GEL 3011	22	10-15		Сферические частицы, рН 2-11. Функциональные группы СН ₂ ОН.
Бенсон BN	7	7-10		Пригоден для эксклюзионной хроматографии. Выпускается с различной степенью сшивки (4,7,8 и 10% дивинилбензола).

^а Список фирм-изготовителей приведен в Приложении 1.

Приложение 9

Тонкодисперсные пористые насадки для анионообменной хроматографии

Название	Изготовитель ^а	Средний диаметр частиц, мкм	Прочность	Функциональные группы	Ионообменная емкость, мэкв	Описание и примечания
На основе SiO ₂						
Лихросорб	5,8,10,13,27,36 13,27,36	10	S	-NR ₃ ⁺	0,55	Основа - силикагель с порами размером 100 А. Рекомендуется для разделения компонентов нуклеиновых кислот.
Микропак АХ	45	5, 10	W	Бифункциональный амин		Рекомендуется для разделения компонентов нуклеиновых кислот.
Микропак SAX	45	10	S	-NR ₃ ⁺		Анионит общего назначения. Пригоден для разделения нуклеотидов.
Нуклеосил SB	1,2,10,14, 23,34,38	5,10	S	-NMe ₃ ⁺ Cl ⁻	1	pH 1-9.
Партисил 10 SAX	2,18,23, 27,33,47	10	S	-NR ₃ ⁺	<1 (оценка)	pH 1,5-7,5
RSIL AN	1,38	5,10	S	-NR ₃ ⁺	<1 (оценка)	
Синхропак АХ-300	4,5,35, 42,45	10	W	Полимерный амин		Средний диаметр пор 300 А, pH 2 - 8. Рекомендуется для разделения белков и ферментов. Монослой.
-2708						
Видак 301 TP	1,3,4,5, 14,39,41	10	S	-NR ₃ ⁺	0,2	pH 1-9. Силикагель покрыт гидрофобной фазой высокой плотности.
Зорбакс SAX	16,23	7	S	-NR ₃ ⁺	<1 (оценка)	pH 2-9.
На полимерной основе						
Аминокс А-28	9,45	9±2 7±10	S	-NR ₃ ⁺	3,2	Степень сшивки всех насадок этого типа 8%.
А-29						
Бенсон ВА-Х	1,7,11	7 - 10	S	-NR ₃ ⁺ Cl ⁻	5	pH 1-12. Степень сшивки различная (x4,x6,x8,x10).
Бенсон ВВА	7	7 - 10	W	-NR ₂ HCl	5	Выпускаются также насадки со степенью сшивки 10-15 мэкв/г.
Хитачи GEL 3011-N	22	10-15	S	-NR ₃ ⁺		pH 2-11. Сферические частицы.

^а Список фирм-изготовителей приведен в Приложении 1

^б S - прочный, W - непрочный.

Приложение 10

Тонкодисперсные пористые насадки для катионообменной хроматографии

Название	Изготовитель ^а	Средний диаметр частиц, мкм	Прочность ^б	Функциональные группы	Ионообменная емкость, мэкв	Описание и примечания
На основе SiO ₂						
Хромегабонд SCX	6	10	S	-SO ₃ H	<1 (оценка)	Средний диаметр пор 60 А.
Лихросорб КАТ	1,5,8,10, 13,23,26	10	S	-SO ₃ ⁻	1,2	Основа - кремнезем с порами диаметром 100 А.
Нуклеосил SA	1,2,14,23, 29,34,38	5, 10	S	-SO ₃ ⁻ Na ⁺	-1	pH 1 - 9.
Партисил-10 SCX	1,2,18,23, 27,33,47	10	S	-SO ₃ ⁻	-1 (оценка)	pH 1,5 - 7,5.
RSIL-КАТ	1,38	5, 10	S	-SO ₃ ⁻		Покрытие 5%.
Видак 401 TP	1,3,4,14, 15,39,41	10	S	-SO ₃ ⁻	-1 (оценка)	
Зорбак SCX	16,23	6 - 8	S	-SO ₃ ⁻	5	pH 2 - 9.
На полимерной основе						
Аминекс А А-5	9,45	13 ± 2	S	-SO ₃ ⁻	5	Степень сшивки всех насадок этого типа 8%.
А-7		7 - 11				
А-8		5 - 8				
А-9		11,5 ± 0,5				
Аминекс НРХ-87	9	9	S	-SO ₃ ⁻	5	

Векман АА W-1	6	12,0 ± 2,5		-SO ₃ ⁻	5	Степень сшивки всех насадок этого типа 8%. Применяются преимущественно для разделения аминокислот.
W-2		9,5 ± 2,0				
W-3		8,5 ± 2,5				
W-4		8,5 ± 1,0				
Бенсон ВСООН	7	7 - 10	W	-COOH	10	
Бенсон ВС-Х	1,7,11 10-15	7 - 10	S	-SO ₃ ⁻ Na ⁺	5,2	pH 1-14. Степень сшивки от x4 до x32. Пригоден также для обращенно-фазовой хроматографии
Хромекс катион	15	11 ± 1	S	-SO ₃ ⁻	5	Степень сшивки 8 или 12%. Катионит общего назначения
Гамильтон НС19		10 - 15	S	-SO ₃ ⁻ Na ⁺	5	
Хитачи гель 3011С	22	10 - 15	W	-COOH	5	pH 2-11. Сферические частицы
Хитачи гель 3011	22	10 - 15	S	-SO ₃ ⁻		

^а Список фирм-изготовителей приведен в Приложении 1

^б S - прочный, W - непрочный.

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие редактора перевода	5
Предисловие к русскому изданию	6
Предисловие	7
1. Введение. <i>Д. Исии, Т. Такеучи</i>	8
1.2. Классификация методов.....	10
1.3. Сравнительная эффективность колонок.....	12
Литература.....	13
2. Особенности аппаратуры, предназначенной для микромасштабной ВЭЖХ. <i>М. Сайто, К. Хиби, Д. Исии, Т. Такеучи</i>	14
2.1. Введение	14
2.2. Основные характеристики микромасштабной ВЭЖХ	17
2.3. Требования к аппаратуре для ВЭЖХ.....	22
2.4. Узлы аппаратуры для ВЭЖХ, совместимые с полумикро- и микроколонок.....	41
Литература.....	43
3. Микроколонки. <i>Д. Исии, Т. Такеучи, А. Уода</i>	45
3.1. Введение	45
3.2. Необходимое оборудование	45
3.3. Предварительное концентрирование пробы на предколонке	48
3.4. Характеристики микроколонок	50
3.5. Открытые (безнасадочные) капиллярные колонки.....	59
3.6. Насадочные капиллярные колонки.....	73
3.7. Полумикроколонки	77
Литература.....	88
4. Детектирующие системы. <i>М. Сайто, К. Хиби, М. Гото</i>	91
4.1. Введение	91
4.2. Детекторы по поглощению света в УФ-диапазоне	92
4.3. Флуоресцентные детекторы.....	102
4.4. Вольтамперметрические детекторы.....	113
Литература.....	121
5. Комбинированные системы, сочетающие микро-ВЭЖХ и другие методы исследования. <i>К. Джинно, С. Цуге</i>	121
5.1. Микроколоночная ВЭЖХ - ИК-спектроскопия	121
5.2. Микроколоночная ВЭЖХ - масс-спектрометрия	131
Литература.....	143
6. Получение производных после хроматографического разделения. <i>М. Сенда, С. Хигашидате</i>	145
6.1. Введение	145
6.2. Размывание пика, обусловленное реакторами.....	146
6.3. Применение	152
Литература.....	157
7. Применение микромасштабной ВЭЖХ. <i>Д. Исии, Т. Такеучи, К. Хиби</i>	158
7.1. Введение	158
7.2. Применение микро-ВЭЖХ.....	158
7.3. Применение полумикро-ВЭЖХ	195
7.4. Высокоскоростная ВЭЖХ.....	214
Литература.....	224
Приложения.....	225
Содержание.....	240