

Е.Л.СТЫСКИН, Л.Б.ИЦИКСОН, Е.В.БРАУДЕ

**Практическая
Высокоэффективная
Жидкостная
ХРОМАТОГРАФИЯ**

**Москва.
1986**

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие.....	6
Введение.....	7
ГЛАВА 1. ОСНОВЫ ТЕОРИИ И ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ ВЭЖХ.....	8
1.1. Эффективность и селективность.....	8
1.2. Размывание в колонке и вне ее.....	12
1.3. Удерживание и сила растворителя.....	14
1.4. Размер частиц сорбента, проницаемость и эффективность.....	14
ГЛАВА 2. КЛАССИФИКАЦИЯ МЕТОДОВ ВЭЖХ ПО МЕХАНИЗМУ РАЗДЕЛЕНИЯ.....	16
2.1. Адсорбционная хроматография.....	16
2.1.1. Адсорбционная хроматография на силикагеле.....	17
2.1.2. Адсорбционная хроматография на оксиде алюминия.....	20
2.1.3. Недостатки адсорбционной хроматографии, ограничивающие ее использование.....	20
2.2. Распределительная хроматография.....	21
2.2.1. Нормально-фазная распределительная хроматография с привитыми фазами.....	22
2.2.2. Обратной-фазная распределительная хроматография с привитыми фазами.....	25
2.2.3. Распределительная хроматография с нанесенными фазами.....	31
2.3. Ионообменная хроматография.....	32
2.3.1. Основы метода.....	32
2.3.2. Выбор подвижной фазы и условий разделения.....	37
2.3.3. Ионная хроматография.....	38
2.3.4. Практические рекомендации.....	39
2.4. Эксклюзионная хроматография.....	41
2.4.1. Основные понятия.....	41
2.4.2. Особенности аппаратуры.....	44
2.4.3. Выбор сорбента.....	45
2.4.4. Выбор растворителя.....	47
2.4.5. Исследование полимеров.....	49
2.4.6. Другие области применения.....	58
ГЛАВА 3. СПЕЦИАЛЬНЫЕ ВАРИАНТЫ ВЭЖХ.....	60
3.1. Препаративная ВЭЖХ.....	60
3.2. Микроколоночная ВЭЖХ.....	63
3.3. ВЭЖХ с градиентом состава растворителя.....	66
3.4. ВЭЖХ с получением производных до и после колоночного разделения.....	69
3.4.1. Получение производных до введения вещества в колонку.....	70
3.4.2. Получение производных после разделения в колонке.....	71
3.5. Ион-парная хроматография.....	75
3.6. Лигандообменная хроматография.....	83
3.7. Определение микропримесей.....	85
3.7.1. Общие положения.....	85
3.7.2. Предварительная подготовка образца и его ввод в хроматограф.....	85
3.7.3. Разрешающая способность колонки.....	86
3.7.4. Детекторы.....	86
3.7.5. Калибровочные графики.....	87

ГЛАВА 4. СОРБЕНТЫ ДЛЯ ВЭЖХ.....	88
4.1. Силикагель, его структура и химия поверхности.....	89
4.2. Оксид алюминия.....	90
4.3. Привитые сорбенты на основе силикагеля для нормально-фазной и обращенно-фазной хроматографии.....	91
4.4. Полимерные сорбенты для распределительной хроматографии.....	101
4.5. Сорбенты для эксклюзионной хроматографии.....	103
4.5.1. Полужесткие гели.....	104
4.5.2. Жесткие гели.....	107
4.6. Сорбенты для ионообменной хроматографии.....	111
ГЛАВА 5. ПРИГОТОВЛЕНИЕ, СОРБЕНТОВ И КОЛОНОК ДЛЯ ВЭЖХ.....	112
5.1. Получение узких фракций для ВЭЖХ из силикагеля для ТСХ и промышленного силикагеля КСК-2.....	113
5.2. Суспензионные методы приготовления колонок для ВЭЖХ.....	115
5.3. Заполнение колонок «сухим» методом.....	122
5.4. Тестирование и оценка качества приготовленных колонок.....	123
5.5. Хранение, регенерация и ремонт колонок для ВЭЖХ.....	123
ГЛАВА 6. ПОДВИЖНАЯ ФАЗА ДЛЯ ВЭЖХ.....	127
6.1. Основные требования к растворителям.....	128
6.2. Элюирующая сила растворителя и элюотропные ряды.....	130
6.3. Смеси растворителей.....	131
6.4. Селективность растворителя.....	132
6.5. Очистка растворителей для ВЭЖХ.....	132
ГЛАВА 7. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ПОДБОРА УСЛОВИИ РАЗДЕЛЕНИЯ.....	136
ГЛАВА 8. АППАРАТУРА ДЛЯ ВЭЖХ.....	138
8.1. Насосы.....	139
8.2. Устройства для формирования градиента.....	143
8.3. Инжекторы.....	147
8.4. Детекторы для ВЭЖХ.....	150
8.4.1. Фотометры для работы в ультрафиолетовом и видимом диапазонах.....	151
8.4.2. Спектрофотометрические детекторы.....	152
8.4.3. Рефрактометрические детекторы.....	154
8.4.4. Флуориметрические детекторы.....	156
8.4.5. Другие детекторы.....	157
8.5. Системы регистрации и обработки данных.....	160
8.5.1. Самописцы.....	160
8.5.2. Интеграторы.....	160
8.6. Вспомогательные устройства для ВЭЖХ.....	161
8.6.1. Сосуды для подвижной фазы.....	161
8.6.2. Проточные фильтры.....	162
8.6.3. Устройства для измерения давления.....	163
8.6.4. Демпферы.....	163
8.6.5. Шприцы для ввода проб.....	164
8.6.6. Измерители скорости потока.....	165
8.6.7. Термостаты колонок.....	165

8.7. Конструкционные материалы для ВЭЖХ, требования к их химической стойкости и прочности.....	166
ГЛАВА 9. КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ.....	169
9.1. Идентификация веществ нехроматографическими методами.....	172
9.2. Спектральный анализ непосредственно в хроматографической системе.....	175
ГЛАВА 10. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ.....	175
10.1. Хроматографическое разделение.....	175
10.2. Измерение площадей или высот пиков.....	177
10.3. Расчет количественного состава смесей (методы калибровки).....	178
10.4. Интерпретация полученных результатов.....	180
ГЛАВА 11. ОСОБЕННОСТИ ТЕХНИКИ ЭКСПЕРИМЕНТА В ВЭЖХ.....	181
11.1. Сборка хроматографической системы.....	181
11.1.1. Соединительные линии.....	182
11.1.2. Соединители и уплотняющие муфты.....	183
11.1.3. Резка и обработка концов капиллярных трубок.....	186
11.1.4. Особенности присоединения детектора.....	187
11.1.5. Запуск и герметизация системы.....	188
11.1.6. Типичные ошибки при сборке системы.....	189
11.2. Подготовка растворителя и пробы.....	189
11.2.1. Дегазация растворителя.....	190
11.2.2. Особенности работы с водными растворителями.....	191
11.2.3. Подготовка раствора пробы.....	191
11.2.4. Подготовка растворов полимерных образцов.....	191
11.3. Выбор варианта ВЭЖХ для анализа.....	192
ГЛАВА 12. ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО РЕМОНТУ, НАЛАДКЕ И ОБСЛУЖИВАНИЮ АППАРАТУРЫ ДЛЯ ВЭЖХ.....	195
Основные поставщики аппаратуры.....	200
<i>Библиографический список.....</i>	<i>202</i>
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	205
1. Свойства сорбентов для ВЭЖХ	
1.1. Свойства адсорбентов и привитых сорбентов для ВЭЖХ	
1.2. Свойства ионообменных смол для ВЭЖХ	
1.3. Свойства ионообменных силикагелей для ВЭЖХ	
1.4. Свойства полужестких сорбентов для эксклюзионной ВЭЖХ	
1.5. Свойства жестких сорбентов для эксклюзионной ВЭЖХ	
2. Свойства основных растворителей для жидкостной хроматографии	
3. Применимость растворителей для эксклюзионной хроматографии различных полимеров	
4. Константы K_c и a в уравнении Марка — Куна — Хаувинка	

ПРЕДИСЛОВИЕ

Бурное развитие жидкостной хроматографии в последние 10 лет обусловлено, главным образом, интенсивной разработкой теоретических основ и практическим использованием ее высокоэффективного варианта, а также созданием и промышленным выпуском необходимых сорбентов и аппаратуры.

Отличительной особенностью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) является использование сорбентов с размером зерен 3-10 мкм, что обеспечивает быстрый массоперенос при очень высокой эффективности разделения.

В настоящее время ВЭЖХ по темпам развития вышла на первое место среди инструментальных методов, обогнав даже газовую хроматографию. Важнейшее преимущество ВЭЖХ по сравнению с газовой хроматографией — возможность исследования практически любых объектов без каких-либо ограничений по их физико-химическим свойствам, например, по температурам кипения или молекулярной массе.

Сегодня ВЭЖХ представляет собой хорошо оформленный инструментальный метод, который широко применяют в самых различных областях науки и техники. Особенно велико его значение в таких важнейших областях, как биохимия, молекулярная биология, контроль загрязнений окружающей среды, а также в химической, нефтехимической, пищевой и фармацевтической промышленности.

По теории и практике ВЭЖХ за рубежом опубликовано более десятка монографий, часть которых переведена в СССР. Однако в большинстве из них, так же как в изданных до 1985г. монографиях советских авторов, многие вопросы практического характера либо рассмотрены очень кратко, либо содержащаяся в них информация устарела и не соответствует современному уровню развития метода. Интенсивное развитие ВЭЖХ стимулирует непрерывное совершенствование аппаратуры, разработку и выпуск новых сорбентов, которые позволяют хроматографисту решать всё более сложные задачи.

Данная книга написана, главным образом, для начинающих хроматографистов. Авторы стремились изложить в простой и доступной форме основы наиболее распространенных вариантов ВЭЖХ с учетом последних достижений метода. Особое внимание уделено практическим вопросам, связанным со спецификой техники современного хроматографического эксперимента и его методическими аспектами.

Детально рассмотрены особенности приготовления высокоэффективных колонок, их регенерации и ремонта, а также сборки хроматографических систем. Специальный раздел книги посвящен наладке, обслуживанию и ремонту аппаратуры.

В приложениях приведены характеристики современных сорбентов, растворителей и наиболее широко используемых приборов для ВЭЖХ, а также некоторые другие полезные сведения.

Авторы надеются, что данное руководство поможет исследователям, независимо от их основной специальности, освоить и грамотно использовать в работе этот мощный и многогранный аналитический метод.

Введение и главы 1, 5, 7, 12, раздел 11.3, приложения 5, 6 и материал по адсорбционной и распределительной хроматографии в главах 2, 4 и приложениях написаны Е. Л. Стыскиным, главы 6, 11, приложения 2-4, 7 и материал по эксклюзионной хроматографии в главах 2, 4 и приложениях — Л. Б. Ициксоном, главы 9, 10 и материал по ионообменной хроматографии в главах 2 и 4 и приложениях — Е. В. Брауде, глава 3 — совместно Е. Л. Стыскиным и Е. В. Брауде, а глава 8 — совместно Е. Л. Стыскиным и Л. Б. Ициксоном.

Авторы будут признательны за полезные критические замечания и советы.

ВВЕДЕНИЕ

Современная высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) — один из эффективных методов анализа и разделения сложных смесей. Она как метод была открыта в 1903 г. русским ученым-ботаником М.С.Цветом, который использовал для разделения растительных пигментов на их составляющие колонки, заполненные порошком мела [1]. При вымывании пигментов петролейным эфиром они перемещались вдоль колонки, разделяясь при этом на кольца разного цвета. Метод оказался очень удобным и был позднее назван Цветом хроматографией (цветописью).

Предложенный Цветом метод жидкостной хроматографии был незаслуженно забыт и почти не применялся более 30 лет. Быстрое развитие в 50-х годах газовой хроматографии, за разработку которой Мартину и Синджу была присуждена в 1952 г. Нобелевская премия, создание удачных конструкций детекторов и узлов газовых хроматографов стимулировали и рост интереса к жидкостной инструментальной хроматографии. Если в 50-е и 60-е годы методы хроматографии в тонких слоях (бумажная и тонкослойная) в значительной мере заменили колоночную как более быстрые, удобные и простые, то 70-е годы характеризуются гигантским прогрессом именно высокоэффективной (инструментальной) жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Она в настоящее время не только в большой мере вытеснила классическую колоночную, бумажную и тонкослойную хроматографию, но и обогнала газовую хроматографию по темпам развития. Быстрый рост применения ВЭЖХ связан с освоением и серийным выпуском как отдельных узлов (насосов, демпферов, инжекторов, детекторов), так и комплектных жидкостных хроматографов. Немалую роль сыграли также разработка теоретических основ ВЭЖХ, организация выпуска высокочистых растворителей и химикатов для ВЭЖХ. Особенно следует отметить организацию выпуска узкодисперсных сорбентов зернением от 3 до 10 мкм на основе силикагеля, в том числе и с химически привитыми неподвижными фазами, и разработку способов заполнения ими высокоэффективных колонок для ВЭЖХ.

Причин быстрого развития ВЭЖХ несколько. Прежде всего следует назвать большой диапазон молекулярных масс веществ, с которыми можно работать: от нескольких единиц до десятков миллионов, что существенно шире, чем в газовой хроматографии. Кроме того, мягкость условий ВЭЖХ (почти все разделения можно проводить при температурах, близких к комнатной, при отсутствии контакта с воздухом) делает ее особенно пригодным, а зачастую единственным методом исследования лабильных соединений, в частности, биологически активных веществ и биополимеров. Эффективность разделения, которую уже сейчас дает ВЭЖХ (до 150000 т. т. на 1 м), существенно превосходит достигнутую в газовой хроматографии (ГХ). Скорость анализа методом ВЭЖХ высокая: обычно разделение сложной смеси занимает несколько минут. ВЭЖХ является таким же точным количественным методом, как и ГХ. Метод ВЭЖХ дает возможность препаративно выделить из сложной смеси в мягких условиях чистые вещества, которые можно далее исследовать другими физико-химическими методами. Наконец, чувствительность, достигаемая в ВЭЖХ, в ряде случаев превосходит чувствительность в ГХ, а высокоселективные детекторы позволяют определять микроколичества веществ в сложных смесях.

Метод ВЭЖХ находит широкое применение в таких областях, как химия, нефтехимия, биология, биотехнология, медицина, пищевая промышленность, охрана окружающей среды, производство лекарственных препаратов и во многих других.

По масштабу ВЭЖХ делится на микроколоночную (колонки диаметром менее 2 мм), аналитическую (2-6 мм), полупрепаративную (7-10 мм), препаративную (10-40 мм) и крупномасштабную препаративную (более 40 мм). Хотя это деление достаточно условно, тем не менее оно очень удобно, так как в зависимости от поставленной задачи требования к насосам, инжекторам, сорбенту и детекторам заметно меняются. Препаративные разделения можно проводить, например, на аналитических и даже микроколонках, а анализы — на полупрепаративных, однако эффективность такой

работы будет низкой. Правильно выбранный масштаб работы позволит наиболее экономно расходовать дорогие растворители и сорбенты и получать при этом максимальный выигрыш в чувствительности, времени анализа или количестве выделенного вещества.

По механизму разделения анализируемых или разделяемых веществ ВЭЖХ делится на адсорбционную, распределительную, ионообменную и эксклюзионную. В адсорбционной хроматографии разделение веществ, входящих в смесь и движущихся по колонке в потоке растворителя, происходит за счет их различной способности адсорбироваться и десорбироваться на поверхности адсорбента с развитой поверхностью, например, силикагеля. В распределительной ВЭЖХ разделение происходит за счет разной растворимости разделяемых веществ в неподвижной фазе, как правило, химически привитой к поверхности неподвижного носителя, и подвижной фазе — растворителе. Этот метод разделения наиболее популярен, особенно в случае, когда привитая фаза представляет собой неполярный алкильный остаток от C_8 до C_{18} , а подвижная фаза более полярна, например смесь метанола или ацетонитрила с водой. Этим вариантом так называемой обращенно-фазной (или обратно-фазной, или с обращением фаз) хроматографии в настоящее время проводят около двух третей разделений в ВЭЖХ. Не совсем удачный, но общепринятый термин «обращенно-фазная ВЭЖХ» произошел от обратного, по сравнению с таковым в классическом адсорбционном варианте, соотношения полярности сорбента и растворителя: полярный сорбент и неполярная подвижная фаза для адсорбционной и, наоборот, неполярный сорбент и полярная подвижная фаза для обращенно-фазного варианта распределительной хроматографии. В ионообменной хроматографии молекулы веществ смеси, диссоциировавшие на катионы и анионы в растворе, разделяются при движении через сорбент, на поверхности которого привиты катионные или анионные центры, способные к обмену с ионами анализируемых веществ за счет их разной скорости обмена. В эксклюзионной (ситовой, гель-проникающей, гель-фильтрационной) хроматографии молекулы веществ разделяются по размеру за счет их разной способности проникать в поры носителя. При этом первыми выходят из колонки наиболее крупные молекулы (наибольшей молекулярной массы), способные проникать в минимальное число пор носителя. Последними выходят вещества с малыми размерами молекул, свободно проникающие в поры сорбента.

Следует иметь в виду, что в практической работе разделение часто протекает не по одному, а по нескольким механизмам одновременно. Так, эксклюзионное разделение бывает осложнено адсорбционными эффектами, адсорбционное — распределительными, и наоборот. При этом чем больше различие веществ в пробе по степени ионизации, основности или кислотности, по молекулярной массе, полярности и др., тем больше вероятность для каких-то веществ неожиданно большого проявления другого механизма разделения.

Дополнительные сведения по теории и практике ВЭЖХ можно найти в работах [2-8].

ГЛАВА 1

ОСНОВЫ ТЕОРИИ И ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ ВЭЖХ

Процесс хроматографического разделения очень сложен, тем не менее его отдельные стадии могут быть смоделированы и представлены в виде уравнений, достаточно точно и верно отражающих реальный процесс. Без знания того, что такое удерживание, эффективность, селективность, нагрузочная емкость, невозможно подойти к решению практических задач по ВЭЖХ, постоянно возникающих перед исследователем независимо от того, в какой области он работает.

1.1. ЭФФЕКТИВНОСТЬ И СЕЛЕКТИВНОСТЬ

Хроматография — это метод разделения компонентов смеси, основанный на различии в равновесном распределении их между двумя несмешивающимися фазами,

одна из которых неподвижна, а другая подвижна. Компоненты образца движутся по колонке, когда они находятся в подвижной фазе, и остаются на месте, когда находятся в неподвижной фазе. Чем больше сродство компонента к неподвижной фазе и чем меньше — к подвижной, тем медленнее он движется по колонке и тем дольше в ней удерживается. За счет различия в сродстве компонентов смеси к неподвижной и подвижной фазам достигается основная цель хроматографии — разделение за приемлемый промежуток времени смеси на отдельные полосы (пики) компонентов по мере их продвижения по колонке с подвижной фазой.

Из этих общих представлений ясно, что хроматографическое разделение возможно только в том случае, если компоненты образца, попадая в колонку при вводе пробы, во-первых, будут растворены в подвижной фазе и, во-вторых, будут взаимодействовать (удерживаться) с неподвижной фазой. Если при вводе пробы какие-то компоненты находятся не в виде раствора, они будут отфильтрованы и не будут участвовать в хроматографическом процессе. Точно так же компоненты, не взаимодействующие с неподвижной фазой, пройдут через колонку с подвижной фазой, не разделяясь на компоненты.

Примем условие, что какие-то два компонента растворимы в подвижной фазе и взаимодействуют с неподвижной фазой, т.е. хроматографический процесс может протекать без нарушений. В этом случае после прохождения смеси через колонку можно получить хроматограммы вида а, б или в (рис. 1.1). Эти хроматограммы иллюстрируют хроматографические разделения, отличающиеся эффективностью (а и б) при равной селективности и селективностью (б и в) при равной эффективности.

Эффективность колонки тем выше, чем уже пик получается при том же времени удерживания. Эффективность колонки измеряется числом теоретических тарелок (ЧТТ) N : чем выше эффективность, тем больше ЧТТ, тем меньше расширение пика

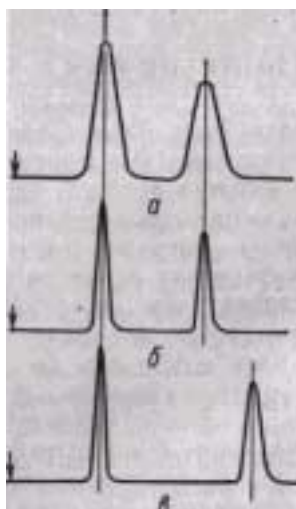


Рис. 1.1. Вид хроматограммы в зависимости от эффективности и селективности колонки: а — обычная селективность, пониженная эффективность (меньше теоретических тарелок), б — обычные селективность и эффективность; в — обычная эффективность, повышенная селективность (больше отношение времен удерживания компонентов)

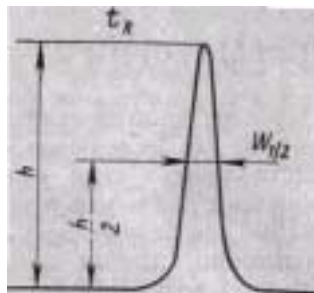


Рис. 1.2. Параметры хроматографического пика и расчет числа теоретических тарелок: t_R — время удерживания пика; h — высота пика; $W_{1/2}$ — ширина пика на половине его высоты

первоначально узкой полосы по мере прохождения ее через колонку, тем уже шик на выходе из колонки. ЧТТ характеризует число ступеней установления равновесия между подвижной и неподвижной фазами. ЧТТ легко определить по хроматограмме (рис. 1.2) последующей формуле:

$$N = 5,54(t_R / W_{1/2})^2$$

Зная число теоретических тарелок, приходящееся на колонку, и длину колонки L (мкм), а также средний диаметр зерна сорбента d_c (мкм), легко получить значения высоты, эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ), а также приведенной высоты, эквивалентной теоретической тарелке (ПВЭТТ):

$$\text{ВЭТТ} = L / N$$

$$\text{ПВЭТТ} = \text{ВЭТТ} / d_c$$

Имея значения ЧТТ, ВЭТТ и ПВЭТТ, можно легко сравнивать эффективность колонок разных типов, разной длины, заполненных разными по природе и зернению сорбентами. Сравнивая ЧТТ двух колонок одной длины, сравнивают их эффективность. При сравнении ВЭТТ сравнивают колонки с сорбентами одинакового зернения, имеющими разную длину. Наконец, величина ПВЭТТ позволяет для двух любых колонок оценить качество сорбента, во-первых, и качество заполнения колонок, во-вторых, независимо от длины колонок, зернения сорбента и его природы.

Селективность колонки играет большую роль в достижении хромато-графического разделения. Селективность колонки α определяется отношением приведенных времен удерживания двух пиков по следующему уравнению:

$$\alpha = (t_{R2} - t_0) / (t_{R1} - t_0)$$

где t_0 - время удерживания несорбируемого компонента; t_{R1} и t_{R2} - времена удерживания компонентов 1 и 2.

Селективность колонки зависит от очень многих факторов, и искусство экспериментатора в большой мере определяется умением воздействовать на селективность разделения. Для этого в руках хроматографиста находятся три очень важных фактора: выбор химической природы сорбента, выбор состава растворителя и его модификаторов и учет химической структуры и свойств разделяемых компонентов. Иногда заметное влияние на селективность оказывает изменение температуры колонки, меняющее коэффициенты распределения веществ между подвижной и неподвижной фазами.

При рассмотрении разделения двух компонентов на хроматограмме и его оценке важным параметром является разрешение R_s , которое связывает времена выхода и ширину пиков обоих разделяемых компонентов (рис. 1.3):

$$R_s = 2 (t_{R2} - t_{R1}) / (W_1 + W_2)$$

Разрешение как параметр, характеризующий разделение пиков, увеличивается по мере возрастания селективности, отражаемой ростом числителя, и роста эффективности, отражаемой снижением значения знаменателя из-за уменьшения ширины пиков. Поэтому быстрый прогресс жидкостной хроматографии привел к изменению понятия «жидкостная хроматография высокого давления» — оно было заменено на «жидкостную хроматографию высокого разрешения» (при этом сокращенная запись термина на английском языке сохранилась HPLC как наиболее правильно характеризующее направление развития современной жидкостной хроматографии). Сокращение, принятое в отечественной литературе, — ВЭЖХ, расшифровываемое как «высокоэффективная жидкостная хроматография», для современной жидкостной хроматографии несколько менее удачно, так как не учитывается важнейший фактор разделения — селективность.

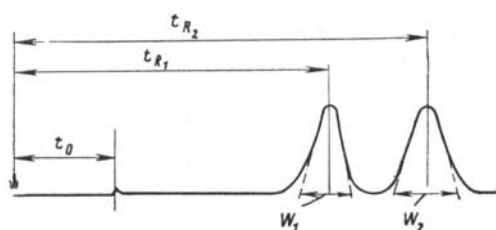


Рис. 1.2. Разрешение пиков и параметры удерживания

Важным параметром удерживания в жидкостной хроматографии является коэффициент емкости k' , определяемый как частное от деления массы вещества в неподвижной фазе на массу вещества в подвижной фазе:

$$k' = m_n / m_p$$

Важное уравнение в жидкостной хроматографии, связывающее основные хроматографические параметры разделения следующее:

$$R_s = \frac{1}{4} [(\alpha - 1) / \alpha] [k_2' / (1 + k_2')] \sqrt{N_2}$$

Разрешение, таким образом, определяется произведением трехсомножителей, первый из которых выражает зависимость от селективности колонки, второй — от коэффициента емкости колонки и третий — от эффективности колонки (ЧТТ).

Рассмотрим это важнейшее уравнение более подробно. Если, $\alpha=1$, то разрешение равно 0, т.е. разделения нет независима от числа теоретических тарелок в колонке. Однако из характера функции α в уравнении видно, что небольшие изменения могут привести к заметному увеличению разрешения, особенно для тех случаев, когда значения α близки к 1. Если за счет подбора условий разделения удастся изменить α с 1,1 до 1,2, это приводит к улучшению разрешения в два раза. Таким образом, на фактор селективности следует обращать основное внимание при подборе условий разделения, учитывая различие во взаимодействии разделяемых компонентов как в неподвижной, так и в подвижной фазе. В отличие от газовой хроматографии, в которой взаимодействия в подвижной (газовой) фазе незначительны и селективность системы в основном определяется только взаимодействиями веществ с неподвижной фазой, в жидкостной хроматографии подвижная (жидкая) фаза не является инертной, а может играть главную роль в процессе термодинамического распределения между неподвижной и подвижной фазами вследствие селективного взаимодействия разделяемых веществ с подвижной фазой. Поэтому в выборе условий для высокоселективного разделения как выбор

сорбента, так и выбор растворителя играют одинаково важную роль, а искусство хроматографиста в ВЭЖХ более многогранно и требует учета большего числа взаимодействий между молекулами, чем в ГХ.

Второй множитель в уравнении принимает значение, равное 0 (при этом разрешение также равно 0, т.е. разделение отсутствует) в том случае, когда коэффициент емкости для второго компонента равен 0, т.е. оба разделяемых компонента элюируются как несорбируемые вещества (взаимодействие с неподвижной фазой отсутствует). С ростом значения k' разрешение увеличивается, при этом скорость анализа падает.

Наконец, из третьего множителя видно, что достигаемое разрешение пропорционально корню квадратному из числа теоретических тарелок, т.е. для увеличения разрешения вдвое нужно увеличить эффективность колонки в 4 раза (например, использовать колонку в 4 раза длиннее). Удлинение колонки в 4 раза приводит к увеличению продолжительности анализа также вчетверо, т.е. скорость анализа падает. Как правило, если эффективность колонки недостаточна, а скорость анализа является важным фактором, идут по другому пути для повышения эффективности — используют колонку с более мелким по зернению сорбентом. Однако в этом случае платой за большую эффективность при той же скорости анализа является повышение давления на колонке.

Следует отметить, что, хотя из уравнения и очевидно, что эффективность колонки меньше влияет на разрешение, чем ее селективность и коэффициент емкости, так как разрешение пропорционально корню квадратному из эффективности, тем не менее повышению эффективности колонок придается большое значение и уделяется огромное внимание как производителями колонок, так и их потребителями. Это связано с тем, что для сложных многокомпонентных смесей, особенно смесей неизвестного состава, часто не удается подобрать условия так, чтобы селективность была высокой для всех компонентов. В этом случае высокая эффективность колонки позволяет добиться разделения для пар веществ с небольшим значением α .

1.2. РАЗМЫВАНИЕ В КОЛОНКЕ И ВНЕ ЕЕ

Вещества вводятся в колонку в виде узкой зоны, которая по мере ее движения с подвижной фазой по колонке становится все шире, т.е. размывается в результате диффузионных процессов. Мерой этого размывания в колонке является высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ). Установлено, что размывание полосы в хроматографической колонке обусловлено тремя причинами: наличием вихревой диффузии, молекулярной диффузии и сопротивления массопередаче. Общая ВЭТТ (H) колонки получается путем суммирования вкладов всех этих факторов, вызывающих размывание хроматографической зоны:

$$H = H_p + H_d + H_s + H_m,$$

где H_p — вклад в размывание вихревой диффузии; H_d — вклад в размывание молекулярной диффузии; H_s — вклад, связанный с сопротивлением массопередаче в неподвижной фазе; H_m — вклад, связанный с сопротивлением массопередаче в подвижной фазе.

Не вдаваясь в подробное рассмотрение этих вкладов в ВЭТТ, тем не менее следует заметить, что чем меньше каждое из четырех слагаемых, тем меньше будет и суммарное значение ВЭТТ и, следовательно, эффективнее колонка. Величина H_p пропорциональна диаметру частиц сорбента и уменьшается с улучшением равномерности заполнения

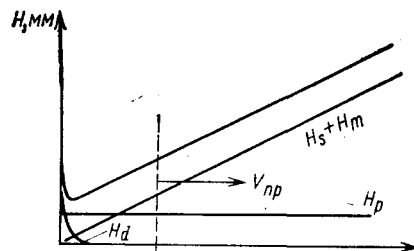


Рис. 1.4. Зависимость ВЭТТ от скорости подачи растворителя (V , мл/мин).
Вклад в размывание пика разных факторов

колонки сорбентом. Величина H_d растет при использовании очень малых скоростей потока, при обычно используемых высоких скоростях H_d настолько мала, что ею можно пренебречь. Величина H_m уменьшается при ускорении процессов адсорбции — десорбции в неподвижной фазе, т. е. при использовании частиц малого размера и тонких пленок неподвижной фазы, при уменьшении скорости потока. Величина H_m уменьшается при уменьшении размера частиц (пропорционально квадрату диаметра частиц), более равномерном и плотном заполнении колонки сорбентом, менее вязком растворителе, меньших скоростях потока.

Если изобразить графически зависимость ВЭТТ от скорости подачи растворителя, то она будет иметь вид, изображенный на рис.1.4. На нем можно видеть и оценить вклад каждой из составляющих в значение ВЭТТ.

Таким образом, размывание в колонке уменьшается и эффективность повышается, когда используют более мелкий сорбент, более равномерный по составу (узкая фракция), более плотно и равномерно упакованный в колонке, при использовании более тонких слоев привитой фазы, менее вязких растворителей и оптимальных скоростей потока.

Однако наряду с размыванием полосы хроматографической зоны в процессе разделения в колонке может происходить также и размывание ее в устройстве для ввода пробы, в соединительных капиллярах инжектор — колонка и колонка — детектор, в ячейке детектора и в некоторых вспомогательных устройствах (микрофильтры для улавливания механических частиц из пробы, устанавливаемые после инжектора, предколонки, реакторы-змеевики и др.). Размывание при этом тем больше, чем больше внеколоночный объем по сравнению с удерживаемым объемом пика. Имеет также значение и то, в каком месте находится мертвый объем: чем уже хроматографическая зона, тем большее размывание даст мертвый объем. Поэтому особое внимание следует уделять конструированию той части хроматографа, где хроматографическая зона наиболее узкая (инжектор и устройства от инжектора до колонки) — здесь внеколоночное размывание наиболее опасно и сказывается наиболее сильно. Хотя считается, что в хорошо сконструированных хроматографах источники дополнительного внеколоночного размывания должны быть сведены до минимума, тем не менее каждый новый прибор, каждая переделка хроматографа должны обязательно заканчиваться тестированием на колонке и сравнением полученной хроматограммы с паспортной. Если наблюдается искажение пика, резкое снижение эффективности, следует тщательно проинспектировать вновь введенные в систему капилляры и другие устройства.

Размывание вне колонки и его неправильная оценка могут привести к значительной (более 50%) потере эффективности, особенно в тех случаях, когда относительно давно сконструированные хроматографы пытаются использовать для высокоскоростной ВЭЖХ, микроколоночной ВЭЖХ и других вариантов современной ВЭЖХ, требующих микроинжекторов, соединительных капилляров с внутренним диаметром 0,05-0,15 мм минимальной длины, колонок вместимостью 10-1000 мкл, детекторов с микроюветами емкостью 0,03-1 мкл и с высоким быстродействием, высокоскоростных самописцев и интеграторов.

1.3. УДЕРЖИВАНИЕ И СИЛА РАСТВОРИТЕЛЯ

Для того чтобы анализируемые вещества разделялись на колонке, как уже упоминалось выше, коэффициент емкости k' должен быть больше 0, т.е. вещества должны удерживаться неподвижной фазой, сорбентом. Однако коэффициент емкости не должен быть и слишком большим, чтобы получить приемлемое время элюирования. Если для данной смеси веществ выбрана неподвижная фаза, которая их удерживает, то дальнейшая работа по разработке методики анализа заключается в выборе такого растворителя, который обеспечил бы в идеальном случае различные для всех компонентов, но приемлемо не очень большие k' . Этого добиваются, меняя элюирующую силу растворителя.

В случае адсорбционной хроматографии на силикагеле или оксиде алюминия, как правило, силу двухкомпонентного растворителя (например, гексана с добавкой изопропанола) увеличивают, увеличивая в нем содержание полярного компонента (изопропанола), или же уменьшают, уменьшая содержание изопропанола. Если содержание полярного компонента становится слишком малым (менее 0,1%), следует заменить его более слабым по элюирующей силе. Так же поступают, заменяя на другие либо полярную, либо неполярную составляющую и в том случае, если данная система не обеспечивает желаемой селективности по отношению к интересующим компонентам смеси. При подборе систем растворителей принимают во внимание как растворимости компонентов смеси, так и элюотропные ряды растворителей, составленные разными авторами.

Примерно так же подбирают силу растворителя в случае использования привитых полярных фаз (нитрил, amino, диол, нитро и др.), учитывая возможные химические реакции и исключая опасные для фазы растворители (например, альдегиды и кетоны для аминофазы).

В случае обращенно-фазной хроматографии силу растворителя увеличивают, повышая содержание в элюенте органической составляющей (метанола, ацетонитрила или ТГФ) и уменьшают, добавляя больше воды. Если не удастся добиться желаемой селективности, используют другую органическую составляющую либо пытаются изменить ее с помощью разных добавок (кислот, ион-парных реагентов и др.).

При разделении методом ионообменной хроматографии силу растворителя меняют, увеличивая или уменьшая концентрацию буферного раствора или меняя pH, в некоторых случаях используют модификацию органическими веществами.

Однако, особенно в случае сложных природных и биологических смесей, зачастую не удается подобрать силу растворителя таким образом, чтобы все компоненты пробы элюировались за приемлемый срок. Тогда приходится прибегать к градиентному элюированию, т.е. использовать растворитель, элюирующая сила которого в процессе анализа изменяется так, что она постоянно увеличивается по заранее заданной программе. Таким приемом удается добиться элюирования всех компонентов сложных смесей за относительно короткий промежуток времени и их разделения на компоненты в виде узких пиков.

1.4. РАЗМЕР ЧАСТИЦ СОРБЕНТА, ПРОНИЦАЕМОСТЬ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ

Рассматривая размывание в колонке, мы указывали, что эффективность колонки (ВЭТТ) зависит от размера частиц сорбента. В большой степени бурное развитие ВЭЖХ за последние 10-12 лет было обусловлено, во-первых, разработкой способов получения сорбентов с размером частиц от 3 до 10 мкм и с узким фракционным составом, обеспечивающих высокую эффективность при хорошей проницаемости, во-вторых, разработкой способов заполнения этими сорбентами колонок и, в-третьих, разработкой и серийным выпуском жидкостных хроматографов, имеющих рассчитанные на высокие давления насосы, инжекторы и детекторы с кюветами малого объема, способные регистрировать пики малого объема.

Для хорошо упакованных суспензионным способом колонок приведенная высота, эквивалентная теоретической тарелке (ПВЭТТ), может составлять 2 независимо от того, использовали ли для упаковки частицы с размером 3, 5, 10 или 20 мкм. В этом случае мы получим соответственно колонки (при стандартной длине их 250 мм) эффективностью 41670, 25000, 12500 и 6250 т.т. Кажется естественным выбрать наиболее эффективную колонку, заполненную частицами размером 3 мкм. Однако за эту эффективность придется заплатить использованием при работе очень высокого давления и относительно невысокой скоростью разделения, так как имеющийся насос, скорее всего, будет неспособен прокачивать через такую колонку растворитель с высокой объемной скоростью. Здесь мы как раз и сталкиваемся с вопросом о связи размера частиц сорбента, эффективности и проницаемости колонок.

Уравнение, которое связывает давление, размер частиц и другие важные хроматографические параметры, имеет следующий вид:

$$u = K^0 p / \eta L = p d_c^2 / \varphi \eta L$$

где u — линейная скорость потока, определяемая из уравнения $t_0 = L / u$; K^0 — проницаемость колонки; p — давление; η — вязкость; L — длина колонки; φ — фактор сопротивления колонки.

Если выразить отсюда фактор сопротивления колонки — безразмерную величину, получим следующее уравнение:

$$\varphi = p d_c^2 t_0 / \eta L^2$$

Фактор сопротивления для колонок, упакованных микрочастицами одного вида по одному и тому же способу, меняется незначительно и составляет следующие значения:

Вид частиц	Неправильная форма	Сферическая форма
Сухая упаковка	1000—2000	800—1200
Суспензионная упаковка	700—1500	500—700

Давление на входе в колонку пропорционально линейной скорости потока, фактору сопротивления колонки, вязкости растворителя и длине колонки и обратно пропорционально квадрату диаметра частиц.

Применив эту зависимость для вышеописанных колонок с частицами диаметром 3, 5, 10 и 20 мкм и предположив постоянными линейную скорость потока, фактор сопротивления колонки и вязкость растворителя, получим для колонок равной длины соотношение давлений на входе 44:16:4:1. Таким образом, если для обращенно-фазного сорбента с размером частиц 10 мкм при использовании систем растворителей метанол — вода (70:30) обычно на стандартной колонке при расходе растворителя 1 мл/мин давление на входе в колонку составляет 5 МПа, то для частиц 5 мкм — 20 МПа и для 3 мкм — 55 МПа. При использовании силикагеля и менее вязкой системы растворителей гексан — изопропанол (100:2) значения будут существенно ниже: соответственно 1, 4 и 11 МПа. Если в случае обращенно-фазного сорбента применение частиц размером 3 мкм очень проблематично, а 5 мкм возможно, но не на всех приборах, то для нормально-фазного проблем с давлением не возникает. Следует отметить, что для современной скоростной ВЭЖХ характерно использование более высокого расхода растворителей, чем в вышерассмотренном примере, поэтому требования к давлению возрастают еще больше.

Однако в тех случаях, когда для разделения требуется определенное число теоретических тарелок и желательно осуществить скоростной анализ, картина несколько меняется. Так как длины колонок с сорбентами зернением 3, 5, 10 мкм при равной

эффективности будут соответственно 7,5 , 12,5 и 25 см, то и соотношение давлений на входе в колонки изменится до 3,3:2:1. Соответственно продолжительность анализа на таких колонках равной эффективности будет соотноситься как 0,3:0,5:1, т. е при переходе от 10 к 5 и 3 мкм продолжительность анализа сократится в 2 и 3,3 раза. За это ускорение анализа приходится расплачиваться пропорционально более высоким давлением на входе в колонку.

Приведенные данные справедливы для тех случаев, когда сорбенты разного зернения имеют одинаковые кривые распределения частиц по размеру, колонки набиты одинаковым способом и имеют одинаковый фактор сопротивления колонки. Следует иметь в виду, что трудность получения узких фракций сорбента возрастает по мере уменьшения размера частиц и что фракции от разных производителей имеют разный фракционный состав. Поэтому фактор сопротивления колонок будет меняться в зависимости от зернения, типа сорбента, способа упаковки колонок и др.

ГЛАВА 2

КЛАССИФИКАЦИЯ МЕТОДОВ ВЭЖХ ПО МЕХАНИЗМУ РАЗДЕЛЕНИЯ

Большинство проводимых методом ВЭЖХ разделений основано на смешанном механизме взаимодействия веществ с сорбентом, обеспечивающим большее или меньшее удерживание компонентов в колонке. Механизмы разделения в более или менее чистом виде на практике встречаются достаточно редко, например, адсорбционный при использовании абсолютно безводного силикагеля и безводного гексана для разделения ароматических углеводородов.

При смешанном механизме удерживания для веществ разного строения и молекулярной массы можно оценить вклад в удерживание адсорбционного, распределительного, эксклюзионного и других механизмов. Однако для лучшего понимания и представления о механизмах разделения в ВЭЖХ целесообразно рассматривать разделения с преобладанием того или иного механизма как относящиеся к определенному виду хроматографии, например, к ионообменной хроматографии.

2.1. АДСОРБЦИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Разделение методом адсорбционной хроматографии осуществляется в результате взаимодействия вещества с адсорбентами, такими, как силикагель или оксид алюминия, имеющими на поверхности активные центры. Различие в способности к взаимодействию с адсорбционными центрами разных молекул пробы приводит к их разделению на зоны в процессе движения с подвижной фазой по колонке. Достигаемое при этом разделение зон компонентов зависит от взаимодействия как с растворителем, так и с адсорбентом.

В основе сорбции на поверхности адсорбента, имеющего гидроксильные группы, лежит специфическое взаимодействие между полярной поверхностью адсорбента и полярными (или способным поляризоваться) группами или участками молекул. К таким взаимодействиям относят диполь-дипольное взаимодействие между постоянными или индуцированными диполями, образование водородной связи вплоть до образования π -комплексов или комплексов с переносом заряда. Возможным и достаточно частым в практической работе является проявление хемосорбции, которая может привести к значительному повышению времени удерживания, резкому снижению эффективности, появлению продуктов разложения или необратимой сорбции вещества.

Изотермы адсорбции веществ имеют линейную, выпуклую или вогнутую форму. При линейной изотерме адсорбции пик вещества симметричен и время удерживания не зависит от размера пробы. Чаще всего изотермы адсорбции веществ нелинейны и имеют выпуклую форму, что приводит к некоторой асимметрии пика с образованием хвоста.

Наибольшее применение в ВЭЖХ находят адсорбенты из силикагеля с разным объемом пор, поверхностью, диаметром пор. Значительно реже используют оксид

алюминия и крайне редко — другие адсорбенты, широко применяющиеся в классической колоночной и тонкослойной хроматографии. Основная причина этого — недостаточная механическая прочность большинства прочих адсорбентов, не позволяющая упаковывать их и использовать при повышенных давлениях, характерных для ВЭЖХ.

Полярные группы, обуславливающие адсорбцию и находящиеся на поверхности силикагеля и оксида алюминия, по свойствам близки. Поэтому обычно порядок элюирования смесей веществ и элюотропный ряд растворителей для них одинаковы. Однако различие химического строения силикагеля и оксида алюминия иногда приводит к появлению различий в селективности — тогда предпочтение отдают тому или другому адсорбенту, более подходящему для данной конкретной задачи. Например, оксид алюминия обеспечивает большую избирательность при разделении некоторых многоядерных ароматических углеводородов.

Предпочтение, отдаваемое обычно силикагелю по сравнению с оксидом алюминия, объясняется более широким выбором силикагелей по пористости, поверхности и диаметру пор, а также значительно более высокой каталитической активностью оксида алюминия, нередко приводящей к искажению результатов анализа вследствие разложения компонентов пробы либо их необратимой хемосорбции.

2.1.1. Адсорбционная хроматография на силикагеле

Адсорбционную хроматографию с использованием в качестве наполнителя колонок силикагеля очень широко применяют в классическом варианте жидкостной хроматографии. При однократном разделении силикагель оказывается достаточно удобным, эффективным и недорогим сорбентом. Очень интенсивно используют силикагель в качестве адсорбента для ТСХ (также однократно). Адсорбционная активность силикагеля достаточно легко воспроизводится путем определенных операций гидроксирования, сушки, активации. Большой опыт применения силикагеля в ТСХ и колоночной хроматографии, естественно, стимулировал широкое его использование на ранних стадиях развития ВЭЖХ.

Обнаружилось, что при многократном использовании достаточно трудно поддерживать колонку с силикагелем в условиях работы, при которых времена удерживания и получаемое разделение оставались бы стабильными (в отличие от ТСХ и классической колоночной ЖХ). Это связано с тем, что алканы, используемые в качестве основных растворителей (*n* - гексан, *n* - гептан, изооктан), содержат очень небольшое количество воды (десятки ппм) в состоянии насыщения или меньше, если их осушали тем или иным способом. Силикагель в колонке, не имеющий на поверхности адсорбированной воды, является эффективным осушителем и отнимает воду от растворителя, меняя при этом свою активность как адсорбент. Хроматографические характеристики его при этом, естественно, также изменяются. Это продолжается до тех пор, пока не установится равновесие между количеством воды, поглощаемой и отдаваемой силикагелем. Если при смене растворителя новая партия будет иметь другую степень насыщенности водой, чем старый растворитель, опять начнется процесс установления нового динамического равновесия, и хроматографические характеристики снова изменятся. Аналогичный процесс может идти и в обратном направлении, когда растворитель хорошо высушен, а силикагель содержит много адсорбированной воды.

Основная проблема здесь состоит в том, чтобы иметь растворитель, например гексан, с постоянной влажностью, например, составляющей 50% от максимальной. Обычно этого добиваются, смешивая непосредственно перед использованием равные объемы гексана, находящегося в равновесии с водой, и абсолютно безводного. Если увлажнение и осушку проводят идентично и воспроизводимо, то и влажность получается одна и та же, силикагель работает в состоянии динамического равновесия» и хроматографические характеристики колонки сохраняются. Правда, установление равновесия занимает много времени, так как для установления первоначального равновесия требуется пропустить через колонку более 200 объемов раство-

рителя. Так же длительно и уравнивание с растворителем новой колонки, обычно заполняемой в присутствии полярных растворителей; рекомендуется последовательная

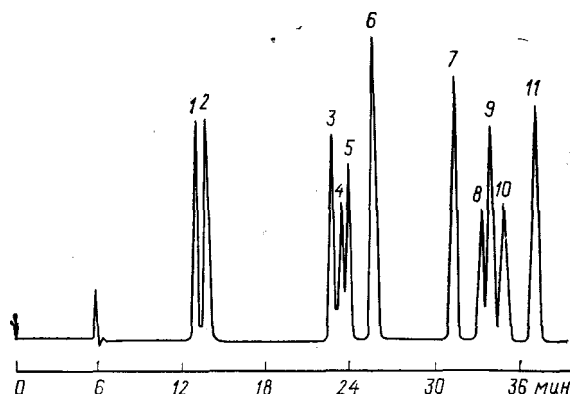


Рис. 2.1. Хроматограмма фенола, крезолов и ксиленолов, полученная на колонке размером 2x250x4.6 мм с зорбаксом Сил (6 мкм), подвижная фаза — гексан — метиленхлорид — изопропанол (100 : 10 : 1 по объему), расход 1 мл/мин, детектор — УФ (254 нм), проба 10 мкл: 1 — 2,4,6-триметилфенол; 2 — 2,6-ксиленол; 3 — 2,5-ксиленол; 4 — 2,3-ксиленол; 5 — 2,4-ксиленол; 6 — о-крезол; 7 — 3,5-ксиленол; 8 — 3,4-ксиленол; 9 — м-крезол; 10 — п-крезол; 11 — фенол

промывка (для ускорения процесса) рядом растворителей, например, последовательно метанолом, метиленхлоридом и гексаном.

Существуют еще методы, которые позволяют получить воспроизводимые хроматографические характеристики колонки с силикагелем. Один из них заключается в использовании безводного гексана, модифицированного для получения нужной селективности метиленхлоридом или ацетонитрилом. Так как их содержание в гексане существенно выше, чем воды (при равной элюирующей силе), равновесие устанавливается существенно быстрее, и его легче поддерживать. При этом задача получения безводного гексана остается.

В другом методе с использованием гексана при его модификации водой применяют так называемую систему контролируемой влажности (СКВ). Метод основан на создании замкнутого цикла растворителя, который после детектора возвращается в систему через большую колонку с обогреваемой термостатом рубашкой. Большая колонка содержит силикагель или оксид алюминия (увлажненные) и служит для удерживания компонентов проб и поддержания требуемой влажности гексана. Увеличивая или понижая температуру в рубашке, можно изменять количество воды в циркулирующем гексане и, следовательно, менять параметры удерживания аналитической колонии. Подробно устройство и работа системы СКВ описаны в литературе [6].

При анализе веществ, достаточно сильно взаимодействующих с силикагелем, например фенолов, спиртов, часто алифатические углеводороды модифицируют спиртами, например изопропанолом. На рис. 2.1 представлена хроматограмма, демонстрирующая высокую селективность в разделении сложной смеси метилфенолов и фенола: разделены изомеры, очень сложно разделяемые методом газовой хроматографии и обладающие очень близкими свойствами, такие, как м и п-крезолы и 2,4- и 2,5-ксиленолы.

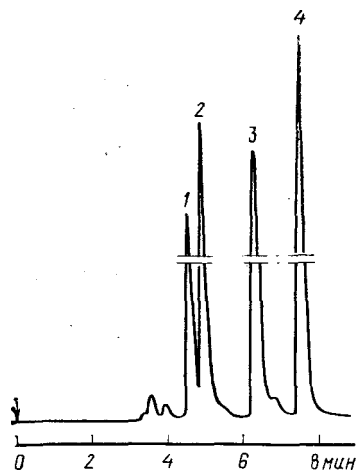


Рис. 2.2. Хроматограмма смеси аминных стабилизаторов полимеров, полученная на колонке размером 250x4,1 мм с силасорбом-600 (5 мкм), подвижная фаза — гексан — метиленхлорид — изопропанол — диэтил-амин (100:10:1:0,01 по объему), расход 1 мл/мин, детектор — УФ (254 нм), проба 2 мкл: 1 — фенил-β-нафтиламин; 2 — N-фенил-N'-изопропил-п-фенилендиамин; 3 — N-1,3-диметилбутил-N'-фенил-п-фенилендиамин; 4 — N,N'-бис(1,4-диметиламил-п-фенилендиамин)

Наиболее сильное влияние на удерживание фенолов оказывает, как видно из хроматограммы, экранирование гидроксильной группы даже такой малообъемной и слабоэкранирующей группой, как метильная. За счет этого различия происходит четкое разделение на 3 группы: *орто* -, *орто'* - замещенные; *орто* - замещенные с неэкранированной гидроксильной группой (не имеющей *орто* - заместителей). Пример разделения аминных стабилизаторов — на рис. 2.2.

В общем виде можно сформулировать следующее положение: удерживание в адсорбционной хроматографии на силикагеле определяется химической природой функциональных групп или групп, способных к взаимодействию с центрами адсорбции на поверхности силикагеля, а также степенью пространственного затруднения при их сближении до наступления такого взаимодействия. В ряду функциональных групп эмпирический ряд увеличения удерживания выглядит следующим образом: фтор — хлор — бром — иод — простой эфир — *трет*-амин — нитрил — нитрогруппа — сложный эфир — кетон — альдегид — первичный амин — амид — спирт — фенолкарбоновая кислота — сульфо-кислота. *транс*-Изомеры удерживаются слабее, чем *цис*-изомеры, изомеры с аксиально расположенными группами — слабее, чем с расположенными экваториально. Если групповое разделение (по типу и количеству функциональных групп) методом адсорбционной хроматографии на силикагеле провести легко, то разделение членов гомологического ряда внутри таких групп, как правило, достигается только для первых членов и быстро падает с ростом числа метиленовых групп.

Популярность силикагеля в качестве сорбента для ВЭЖХ начала падать с появлением и ростом применения полярных привитых сорбентов, таких, как амин, нитрил и диол. Последние более удобны в работе и позволяют подбирать селективность, меняя фазу. Тем не менее есть качества силикагеля, которые обеспечивают ему достаточно надежное будущее в ВЭЖХ. Это прежде всего относительная дешевизна силикагеля, дающая ему большие преимущества при препаративных разделениях, особенно в том случае, когда масштаб их приближается к производственному. Это хорошая механическая прочность, возможность регулировать размер и объем пор, иметь такой сорбент, который можно отмыть кислотой от ионов металлов переменной валентности, прокалить при высокой температуре и т.д. Поэтому, хотя следует ожидать дальнейшего уменьшения использования силикагеля в аналитической практике, его производство и потребление будут увеличиваться за счет препаративной хроматографии.

2.1.2. Адсорбционная хроматография на оксиде алюминия

Оксид алюминия, так же как и силикагель, широко используют в колоночной хроматографии низкого давления и в ТСХ. Так как имелся большой опыт разделений, вначале его достаточно интенсивно применяли для ВЭЖХ. Однако постепенно его применение уменьшалось, и в настоящее время встречаются единичные работы, связанные с применением оксида алюминия в качестве адсорбента. Фирмы или не производят сорбентов такого типа, или же производят ранее разработанные (возможно, даже давно произведенные), не разрабатывая новых вариантов.

С чем это связано? Как правило, разделения, которые проводят на оксиде алюминия, легко могут быть перенесены на силикагель или же на привитофазные полярные сорбенты на его основе. Химическая же однородность поверхности силикагеля выше. Каталитическая активность оксида алюминия значительно выше, он гораздо чаще вызывает разложение компонентов пробы или их необратимую сорбцию. При одинаковой цене за грамм в колонку с оксидом алюминия требуется его в два раза больше по массе, чем силикагеля, что вдвое дороже.

Можно считать, что в настоящее время использование оксида алюминия в качестве адсорбента в какой-то мере стимулируется тем, что многие исследователи его имеют и используют, когда пытаются перейти от ТСХ разделений на оксиде алюминия к ВЭЖХ варианту. Используют его и в тех случаях, когда воспроизводят опубликованные более ранние работы.

Однако следует признать, что, за исключением некоторых особых случаев применения, когда сорбенты на основе оксида алюминия показали повышенную селективность по сравнению с силикагелем (например, в разделении многоядерных ароматических углеводородов, некоторых аминов), применение силикагеля более целесообразно.

2.1.3. Недостатки адсорбционной хроматографии, ограничивающие ее использование.

Популярность адсорбционной хроматографии по мере развития метода ВЭЖХ постепенно падала, она все больше заменялась и продолжает заменяться на другие варианты, такие, как обращенно-фазная и нормально-фазная ВЭЖХ на сорбентах с привитой фазой. Какие же недостатки адсорбционной хроматографии привели к этому?

Прежде всего, это большая длительность процессов уравнивания адсорбентов с растворителями, содержащими воду в микроколичествах, трудность приготовления таких растворителей с определенной и воспроизводимой влажностью. Из этого следуют плохая воспроизводимость параметров удерживания, разрешения, селективности. По этой же причине невозможно использовать градиентное элюирование — возврат к исходному состоянию настолько длителен, что значительно превосходит выигрыш времени за счет использования градиента.

Существенные недостатки адсорбентов, особенно оксида алюминия, связанные с частыми случаями перегруппировок чувствительных к катализу соединений, их разложения, необратимой сорбции, также общеизвестны и неоднократно отмечались в литературе. Необратимо сорбирующиеся вещества, накапливаясь на начальном участке колонки, меняют природу сорбента, могут привести к повышению сопротивления колонки или даже к полной ее забивке. Последний недостаток может быть устранен путем использования предколонки, которая по мере повышения сопротивления и забивки заменяется на новую или перезаполняется новым сорбентом. Однако необратимая сорбция, имеющая место и в этом случае, приводит к получению хроматограммы, на которой полностью или частично отсутствуют чувствительные к сорбции или каталитическому разложению компоненты пробы.

2.2. РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Распределительная хроматография — это вариант ВЭЖХ, в котором разделение смеси на компоненты осуществляется за счет различия их коэффициентов распределения между двумя несмешивающимися фазами: растворителем (подвижная фаза) и фазой на сорбенте (неподвижная фаза). Исторически первыми были сорбенты такого типа, которые получали нанесением жидких фаз (оксидипропионитрила, парафинового масла и др.) на пористые носители, аналогично тому, как готовили и готовят сорбенты для газожидкостной хроматографии (ГЖХ). Однако сразу же обнаружились и недостатки таких сорбентов, основным из которых было относительно быстрое смывание фазы с носителя. За счет этого количество фазы в колонке постепенно уменьшалось, времена удерживания также уменьшались, на начальном участке колонки появлялись не покрытые фазой центры адсорбции, вызывавшие образование хвостов пиков. С этим недостатком боролись, насыщая растворитель нанесенной фазой еще до его попадания в колонку. Унос также уменьшался, когда использовали более вязкие и менее растворимые полимерные фазы, однако в этом случае из-за затруднения диффузии из толстых полимерных пленок эффективность колонок заметно снижалась.

Логическим оказалось привить химическими связями жидкую фазу к носителю таким образом, чтобы унос ее стал физически невозможен, т.е. превратить носитель и фазу в одно целое — в так называемый привито-фазный сорбент.

Первые привито-фазные сорбенты были получены замещением силанольных групп, находящихся на поверхности силикагеля, в результате их реакции со спиртами или аминами. При этом отщеплялась вода, а остатки спиртов или аминов химически прививались к поверхности силикагеля. Эти так называемые «щеточные» сорбенты показали, что с их использованием действительно удастся получить высокую эффективность колонок при отсутствии уноса фазы из колонки и стабильности времен удерживания. Однако устойчивость таких сорбентов в условиях применения водных растворов и даже слабоосновных или кислых сред была низкой: фаза отщеплялась химически за счет реакции гидролиза.

В дальнейшем усилия исследователей были направлены на поиск реагентов, прививка которых протекала бы достаточно быстро и полно, а образовавшиеся связи были максимально устойчивыми. Такими реагентами стали алкилхлорсиланы и их производные, позволившие по сходной технологии получать привито-фазные сорбенты разного типа и с разными как полярными, так и неполярными группами на поверхности.

Успешное применение сорбентов последнего типа для ВЭЖХ способствовало росту их производства самыми разными производителями. Каждая фирма производила такие сорбенты, как правило, на основе своего вида силикагеля и по своей технологии, которая обычно составляет «ноу-хау» производства. В результате большое количество сорбентов, называющихся химически совершенно одинаково (например, силикагель с привитым октадецилсиланом), имеют очень сильно различающиеся хроматографические характеристики. Это связано с тем, что силикагель может иметь поры шире или уже, разную поверхность, пористость, его поверхность до прививки может гидроксिलироваться или нет, прививаться могут моно-, ди- или трихлорсиланы, условия прививки могут давать мономерный, полимерный или смешанный слой фазы, используются разные методы удаления остатков реагентов, может использоваться или не использоваться дополнительная дезактивация силанольных и других активных групп.

Сложность технологии прививки реагентов и подготовки сырья и материалов, ее многостадийность приводят к тому, что даже полученные по одной технологии на одной фирме-производителе партии сорбентов могут иметь несколько разные хроматографические характеристики. Особенно это касается тех случаев, когда такие сорбенты используют для анализа многокомпонентных смесей, содержащих вещества, заметно различающиеся по количеству и положению функциональных групп, по роду функциональности [9, 10].

Учитывая вышеуказанное, всегда следует стремиться к тому, чтобы при использовании описанной в литературе методики анализа применять именно тот самый сорбент и те же условия работы. В этом случае вероятность того, что работу не удастся воспроизвести, является минимальной. Если же такой возможности нет, а берется сорбент другой фирмы с аналогичной привитой фазой, нужно быть готовым к тому, что потребуются длительная работа по переделке методики. При этом существует вероятность (и ее следует учитывать), что на этом сорбенте даже и после длительной разработки можно не добиться требуемого разделения. Наличие в литературе многих описанных методик разделения на давно производимых старых сорбентах стимулирует их дальнейшее производство и применение по этой причине. Однако в тех случаях, когда приходится переходить к разработке оригинальных методик, особенно применительно к веществам, склонным к разложению, хемосорбции, перегруппировкам, целесообразно начинать работу на сорбентах, разработанных в последнее время и выпускаемых по новым, улучшенным вариантам технологии. Новые сорбенты имеют более однородный фракционный состав, более однородное и полное покрытие поверхности привитой фазой, более совершенные окончательные стадии обработки сорбентов.

Перейдем теперь к рассмотрению групп привито-фазных сорбентов, являющихся в настоящее время основными в ВЭЖХ, а также сорбентов с нанесенными фазами для распределительной хроматографии.

2.2.1. Нормально-фазная распределительная хроматография с привитыми фазами

Недостатки, присущие адсорбционной хроматографии и подробно рассмотренные в разделе 2.1.3, а также стремление исследователей преодолеть недостатки, характерные для распределительной хроматографии с нанесенными полярными фазами, способствовали разработке сорбентов с привитыми полярными фазами. Такие сорбенты, по крайней мере основных типов, нашедших наиболее широкое применение, в настоящее время выпускаются большинством производителей.

Основными привитыми фазами для нормально-фазной распределительной хроматографии в настоящее время являются нитрильная и аминная. Каждая из них прививается с использованием соответствующего силана (диметиламинопропилхлор или диметилцианпропилхлорсилана). Нитрильная и аминная привитые фазы могут быть поэтому использованы в двух вариантах: для нормально-фазной (с неполярными элюентами) и обращенно-фазной (с полярными элюентами) распределительной ВЭЖХ. В качестве нормально-фазных сорбентов они работают, подобно силикагелю или оксиду алюминия, с теми же элюотропными рядами

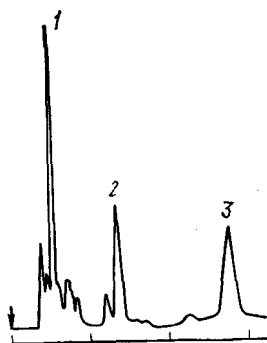


Рис. 2.3. Хроматограмма витаминов в пищевых продуктах, полученная на колонке размером 250x4 мм с нуклеосилом NH₂ (10 мкм), подвижная фаза — гептан — хлороформ (80:20 по объему), расход 3,5 мл/мин, детектор—УФ (254 нм), проба 5 мкл: 1 — уксусный эфир витамина А; 2 — витамин Е; 3 — витамин Д₃

растворителей и близкими (но не идентичными) порядками элюирования соединений разных классов. За счет разной химической природы силанольных, amino- и нитрильных групп нередко возникает различие в селективности разделения, позволяющее отдать предпочтение тому или иному сорбенту.

Основными преимуществами сорбентов с привитыми нитрильными или amino-группами по сравнению с адсорбентами являются следующие: 1) вследствие отсутствия силанольных групп вероятность необратимой адсорбции веществ заметно уменьшается; 2) заметно уменьшается влияние воды на хроматографическое разделение, отпадает необходимость строго контролировать содержание воды в растворителях; 3) быстро достигается равновесие с новым составом растворителя, что позволяет быстро переходить от методики к методике или успешно использовать градиентное элюирование; 4) возможно использование растворителей в широком диапазоне полярностей, колонки легко могут быть регенерированы; 5) сорбенты с привитыми amino-группами проявляют свойства слабых анионообменников.

Следует принимать во внимание и некоторые особенности применения сорбентов с amino-фазами. Не рекомендуется использовать в качестве растворителей и компонентов проб вещества с альдегидными или кетонными группами, так как в этом случае возможно разрушение структуры привитой фазы с образованием оснований Шиффа или исчезновение некоторых компонентов проб. Amino-фаза может быть легко окислена, поэтому следует исключить действие на сорбент сильных окислителей. Аналогично, при использовании нитрильной привитой фазы следует поинтересоваться, не реагируют ли с нитрилами выбранный растворитель или компоненты, входящие в состав пробы.

Нитрил и amino-фазы применяют в биологии, медицине, биохимии, фармакологии и др. (рис. 2.3-2.5). Эти фазы нашли наиболее широкое признание и выпускаются почти всеми производителями сорбентов (см. Приложение 14.1). Некоторые фирмы выпускают варианты amino-фаз, содержащие, например, диэтиламиноэтильные или диметиламинопропильные группы.

Достаточно широко применяют также еще одну привитую полярную фазу — так называемую «диольную», или просто «диол», которая содержит в составе привитой группы две гидроксильные группы. Ее селективность также будет несколько отличной из-за другой химической природы полярных групп. Сорбенты с такими привитыми фазами выпускают значительно меньшее число производителей.

Сорбенты с другими привитыми полярными группами (за исключением ионообменников) выпускаются еще меньшим числом фирм или же всего одной-двумя, а их применение также достаточно редко. Это связано с тем, что какая-то особая селективность, оправдывающая их применение (рис. 2.6), отмечается довольно редко. С чем же связано то, что многие привитые полярные фазы разных типов, которые были разработаны и даже производились, не приобрели заметной популярности? Ведь в ГЖХ этот путь является основным, позволяющим добиться разделения на колонке — новая фаза с особыми свойствами, дающая высокую селективность.

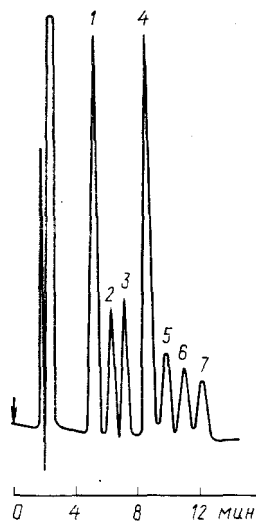


Рис. 2.4. Хроматограмма моносахаридов, полученная на колонке размером 250x4,6 мм с полигосилом 60 NH₂ (5 мкм), подвижная фаза — ацетонитрил — вода (75:25 по объему), расход 2 мл/мин, детектор — УФ (190 нм): 1 — рамноза; 2 — ксилоза; 3 — арабиноза; 4 — фруктоза; 5 — манноза; 6 — глюкоза; 7 — галактоза

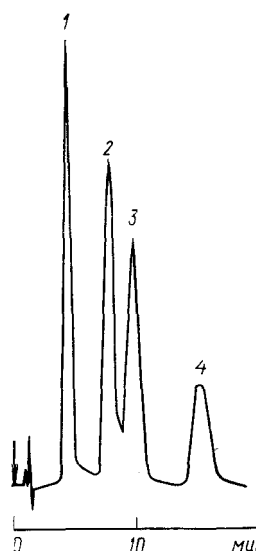


Рис. 2.5. Хроматограмма цитохромов Ц разного происхождения, полученная на колонке размером 250x4 мм с нуклеосилом CN (5 мкм), подвижная фаза — 0,05 M раствор сульфата натрия в 0,1 M фосфатном буферном растворе (pH 2,0) — ацетонитрил (77,5:22,5 по объему), расход 1 мл/мин, детектор — УФ (400 нм): 1 — лошади; 2 — быка; 3 — собаки; 4 — тунца

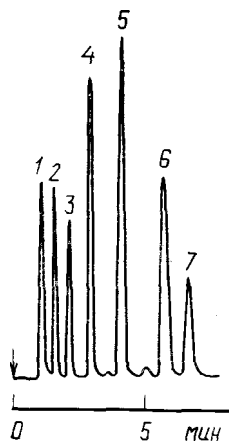


Рис. 2.6. Хроматограмма полициклических углеводородов, полученная на колонке размером 150x4,6 мм с нуклеосилом NO₂ (5 мкм), подвижная фаза — изооктан, расход 1,4 мл/мин, детектор УФ (254 нм), проба 20 мкл:

1 — бензол; 2 — нафталин; 3 — фенантрен; 4 — флюорен; 5 — пирен; 6 — 1,3,5-трифенилбензол; 7 — хризен

Главная причина в том, что в ГЖХ молекулы разделяемого вещества вступают во взаимодействие с неподвижной фазой непосредственно, а в ВЭЖХ — только через молекулы сольватированного растворителя, которого тем больше (а влияние привитой группы — слабее), чем больше сольватирующие способности растворителя и сольватируемость полярных групп привитой фазы. Хотя природа привитых полярных групп (нитрил, амин, диол) заметно различается, нивелирующее действие сольватационных оболочек сглаживает эти различия. Поэтому улучшение разрешения заменой сольватирующей полярную группу молекулы или группы молекул на новую путем модификации состава растворителя, введения новых компонентов растворителя или добавок к нему (при сохранении той же привитой полярной группы) часто не только проще для хроматографиста, но и дает существенно более значимый результат.

2.2.2. Обращенно-фазная распределительная хроматография с привитыми фазами

Вариант распределительной хроматографии, в котором используют сорбент с привитыми неполярными (как правило, длинными алкильными или алкилсилильными) группами и полярный растворитель, например водный метанол, получил название обращенно-фазной ВЭЖХ. Этот не совсем удачный термин, указывающий на перемену полярности неподвижной и подвижной фаз на противоположные в данном варианте ВЭЖХ прижился и стал общепринятым, означая: подвижная фаза полярна, неподвижная — неполярна. В отличие от недостаточно удачного названия сам метод оказался настолько удачным, что в настоящее время является основным в ВЭЖХ. По общим оценкам, каждые два деления из трех, появляющихся в литературе и используемых в практической работе, относятся к обращенно-фазной ВЭЖХ в ее разных вариантах, т.е. 60—70% работы в данное время проводят этим методом. В чем же причина такой популярности обращенно-фазной хроматографии, что на все остальные варианты ВЭЖХ (адсорбционную, распределительную нормально-фазную, ионообменную, эксклюзионную и другие) приходится менее одной трети применений?

Причин таких несколько, и каждая сыграла роль в широком использовании метода обращенно-фазной ВЭЖХ. Были разработаны и быстро внедрены в производство сорбенты для этого метода, имеющие привитые алкилсилильные группы разной длины (от C₂ до C₁₈ с прямой алкильной цепью, фенильной и ди-фенильной группами). Растворители, используемые для этого метода (ацетонитрил, метанол, вода, в меньшей мере — тетра-гидрофуран), позволяют работать в широком УФ-диапазоне, так как они УФ-прозрачны со 190-210 (ТГФ — с 220) нм. Это позволяет применять наиболее популяр-

ный детектор — УФ-спектрофотометр как при 190-210 нм, где он детектирует неселективно, и поэтому приближается к универсальному детектору (анализ Сахаров, жиров, сложных эфиров, спиртов, олефинов), так и при любой длине волны, обеспечивающей селективное детектирование (например, витамина А при 325 нм). Растворители, используемые в обращенно-фазных разделениях, относительно легко растворяют практически все важнейшие группы веществ, находящихся в организме человека, биологических объектах, используемых в виде лекарственных препаратов, пестицидов, гербицидов широко используемых в органической химии, нефтехимии, биоорганической химии (рис. 2.7-2.10). Сорбенты в обращенно-фазной ВЭЖХ быстро приходят в равнове-

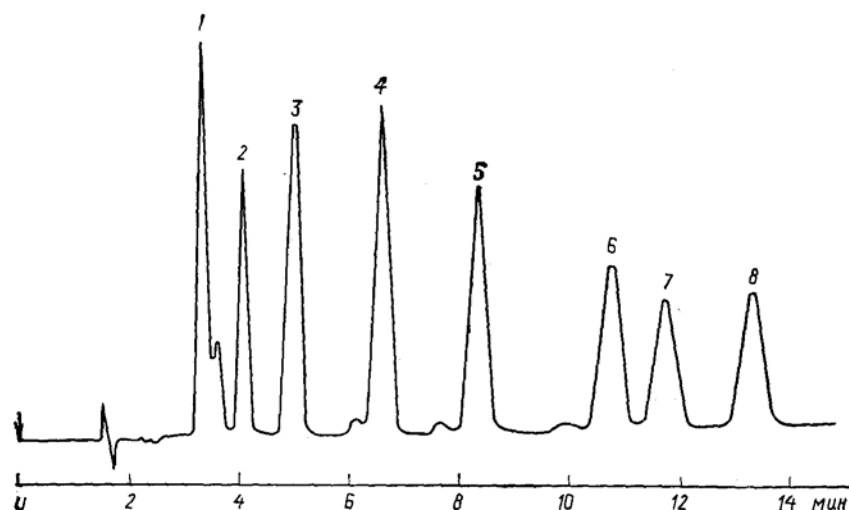


Рис. 2.7. Хроматограмма смеси ароматических углеводородов, полученная на колонке размером 250x4,6 мм с зорбаксом ОДС (6 мкм), подвижная фаза — метанол — вода (90:10 по объему), расход 1,5 мл/мин, детектор УФ (254 нм), проба 20 мкл: 1 — толуол; 2 — *o*-ксилол; 3 — *трет*-бутилбензол; 4 — *n-трет*-бутилтолуол; 5 — *n-трет*-амилтолуол; 6 — *n-трет*-гексилтолуол; 7 — 3,5-ди-*трет*-бутилтолуол; 8 — *трет*-гексил-*o*-ксилол

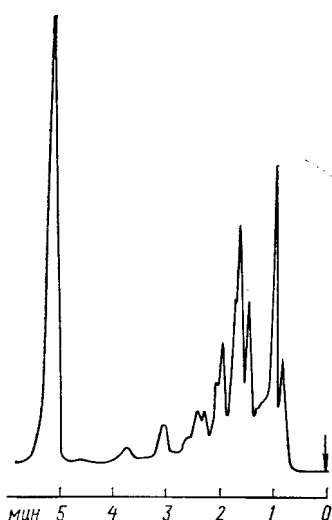


Рис. 2.8. Хроматограмма натурального кофе, полученная на колонке размером 150x4,6 мм с нуклеосилом С8 (5 мкм), подвижная фаза — метанол — 0,01 М фосфатный буферный раствор с рН 7,0 (20:80), расход 1,2 мл/мин, давление 12 МПа, температура 25 °С, детектор Уф (280 нм), проба 20 мкл: 1 — кофеин

сие с новыми растворителями и при изменении состава растворителя, что позволяет переходить от одной методики к другой с использованием одной и той же колонки, а

также широко применять градиентное элюирование с быстрым восстановлением равновесия сорбента с исходным растворителем. Сорбенты дают возможность использовать растворители в широком диапазоне свойств, а также добавки разных типов (соли, кислоты и основания, ион-парные реагенты, органические модификаторы). Регенерация растворителей высокой чистоты может быть осуществлена с использованием четкой ректификации. Загрязненный сорбент в колонке может быть промыт и приведен снова в рабочее состояние при прокачивании через колонку растворителей, удаляющих загрязнения.

Однако в обращенно-фазной хроматографии существуют и некоторые проблемы, которые нужно принимать во внимание и которые часто затрудняют, особенно для начинающих, использование метода. Прежде всего, характеристики удерживания и селективности для обращенно-фазных сорбентов меняются не только при переходе от сорбента одного производителя к сорбенту другого (например, от сферисорба ОДС к партисилу ОДС), формально определяемых как идентичные (силикагель с привитым октадецилсиланом). Эти характеристики меняются более или менее значительно даже при переходе от одной партии сорбента к другой партии того же производителя. Проблема эта была отмечена еще в самом начале производства и применения обращенно-фазных сорбентов, однако она не решена и до настоящего времени в полном объеме. Подробнее причины этого будут рассмотрены с точки зрения химии поверхности сорбента в разд. 5.3. Здесь можно отметить одну — то, что исходные силикагели, используемые разными фирмами, заметно различаются по поверхности, объему и размеру пор.

Для прививки фаз, которые далее называют одинаково, применяют разные агенты, при этом их чистота (технических сортов, используемых для производства) также различна. Напри мер, для получения привитой фазы ОДС (октадецилсилан) используют

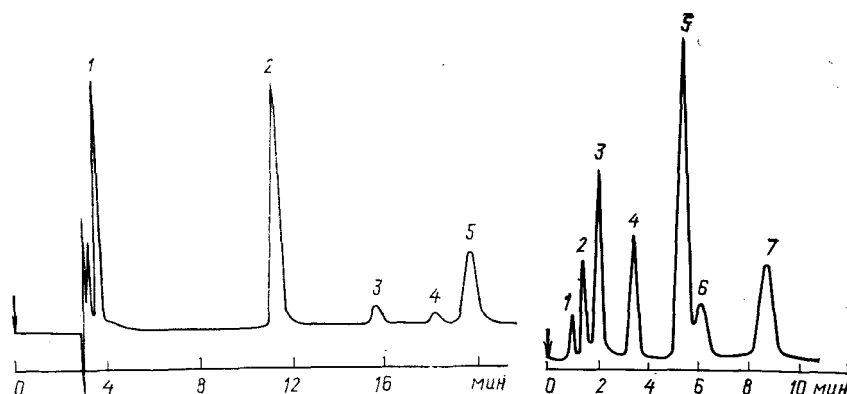


Рис. 2.9. Хроматограмма смеси полибромсодержащих антипиренов, полученная на колонке размером 250x4,6 мм с зорбаксом ОДС, подвижная фаза — метанол, расход 1 мл/мин, детектор—УФ (254 нм), проба 10 мкл: 1 — гексабромбутен-2; 2 — гексабромбензол; 3,4 — примеси; 5 — декабромдифенилоксид

Рис. 2.10. Хроматограмма наркотических веществ, полученная на колонке размером 250X4 мм с нуклеосилом С18 (10 мкм), подвижная фаза метанол—вода (55:45 по объему), расход 3,5 мл/мин, давление 14 МПа, детектор—УФ (254 нм), проба 5 мкл: 1 — примесь; 2 — веронал; 3 — люминал; 4 — проминал; 5 — ревинал; 6 — примесь; 7 — тию-генал

октадецилтрихлорсилан, метилоктадецилдахлорсилан и диметил-октадецилхлорсилан. Если используют ди- или три-функциональные силаны, то в зависимости от степени безводности растворителей и силикагеля, на поверхности может получиться мономерная пленка фазы (монослой) или же полимерная (чем больше воды, тем выше степень полимеризации). Свойства мономерной и полимерных пленок с разной степенью полиме-

ризации заметно различаются. Наконец, силанольные группы, находящиеся на поверхности исходного силикагеля, к которым прививается фаза, не могут из-за пространственных затруднений быть полностью замещены, например, диметилоктадецилсилильными группами: в самых жестких условиях прививки удастся заместить примерно половину силанольных групп. Остающиеся силанольные группы не удастся полностью устранить даже в процессе так называемого окончательного покрытия поверхности силикагеля («энд кэппинга»), когда используют молекулы более активного низкомолекулярного силана (обычно триметилхлорсилана). Силанольные группы на поверхности такого привитого сорбента могут взаимодействовать с некоторыми компонентами пробы и в некоторых случаях быть основным фактором, отвечающим за удерживание. Нередко они действуют не непосредственно, а через посредство малых поляризуемых молекул растворителя (метанола, воды), сольватированных силанольными группами. В некоторых случаях, когда в удерживании вещества участвуют как привитые, так и силанольные группы, это приводит к образованию хвостов пиков.

Интересно проследить, как производители сорбентов меняли свои программы по мере развития представления о химии поверхности привитых сорбентов и о роли силанольных остаточных групп. Например, фирма «Ватман» первоначально выпускала только один сорбент вида ОДС — партисил ОДС, который был одним из первых появившихся в продаже обращенно-фазных сорбентов и широко применялся. Однако содержание углерода в нем составляло только 5%, и степень покрытия поверхности составляла 50% от возможной. Далее был выпущен партисил ОДС-2, который содержал уже 15% С, но степень покрытия поверхности увеличилась только до 75%, т.е. покрытие стали получать более плотное, и пленка стала полимерной. Последним появился партисил ОДС-3, содержащий 10% углерода, однако со степенью покрытия 95%. Это достигнуто за счет того, что привитая фаза стала мономерной и окончательное покрытие проводилось дополнительно. Аналогично партисилам ОДС выпущены сферисорбы ОДС и ОДС-2, Р-силы С18 двух типов («высокой прививки» и «низкой прививки»). Те же производители сорбентов, которые появились на рынке позже и использовали технологию, учитывающую недостатки старых сорбентов и технологий их получения, как правило, сразу выпускали сорбент с максимальным покрытием поверхности мономерным слоем фазы, а для устранения остаточных силанольных групп пользовались окончательным покрытием.

У начинающего хроматографиста сразу возникает вопрос: почему производители не заменяют старый сорбент, который вроде бы хуже, на новый, а выпускают новый дополнительно? Второй вопрос, так же естественно возникающий: если есть новые, более совершенные сорбенты с улучшенной химией поверхности, то почему продолжают производить и покупать старые сорбенты, например лихросорб РП-18, при этом часто по ценам, даже более высоким? Конечно, причина не в том, что старые сорбенты хорошо и умело рекламируются: та же фирма «Ватман» рекомендует теперь партисил ОДС как «уникальный сорбент, работающий и по механизму обращенно-фазной, и по механизму адсорбционной хроматографии», партисил ОДС-2 — как «рабочую лошадку исследовательской лаборатории, стабильно и длительно работоспособную», а партисил ОДС-3, естественно, как «наиболее инертную обращенную фазу с оптимальным покрытием и наименьшим влиянием остаточных силанольных групп».

Причина в том, что не только производители, но и хроматографисты заинтересованы в выпуске старых сорбентов наряду с новыми, более совершенными. Приобретая старый сорбент, хроматографист приобретает и возможность использовать все имеющиеся в литературе разработки, выполненные на этом сорбенте. Переход на другой сорбент, как правило, сопряжен с большими затратами труда и времени на переработку и доводку методики — нередки случаи, когда после длительной работы исследователь убеждается в том, что на новый сорбент перенести методику не удастся. Каждый сорбент в чем-то уникален по свойствам, и полное совпадение их у двух сорбентов хотя в принципе и возможно, однако маловероятно. Поэтому чем больше выбор сорбентов и заполненных ими колонок у исследователя, тем легче ему работать, тем легче использовать накоп-

ленный опыт, тем меньше времени он тратит на переделки методик. Это не значит, конечно, что, воспроизведя методику, исследователь не может попытаться использовать более новый и эффективный сорбент, другой растворитель и т.п. — он все это может спокойно попробовать, зная, что в случае неудачи вернется к воспроизведенной методике с использованием сорбента ранее упомянутого в литературе.

Из этого обсуждения следует еще один важный вывод: ни один сорбент, как бы хорош он ни был по химии поверхности, технологии получения, не может быть использован для воспроизведения или решения любых методик или задач. Исследователь всегда должен располагать возможностью использовать ряд сорбентов для решения возникающих аналитических задач.

Поэтому на третий вопрос, который обычно задают начинающие хроматографисты, — какой обращенно-фазный сорбент является наилучшим, — ответить однозначно не удастся ни одному исследователю с большим опытом работы. Обычно он честно и коротко говорит: «Я не знаю». Он может сказать, какой сорбент или сорбенты наиболее подходят для его работы, которые поэтому наилучшие для него. Он может поделиться опытом работы с этими сорбентами, знает, как их упаковывать, с какими растворителями работать, как регенерировать. Однако дать совет, какой сорбент является наилучшим вообще, очевидно, не может никто, независимо от предшествующего большого опыта.

Одна из причин, способствовавших быстрому росту применения обращенно-фазных сорбентов в ВЭЖХ, — это их способность четко разделять серии гомологов в порядке возрастания их молекулярной массы, делающая их в этом чем-то сходными с популярными в ГЖХ полиметилсилоксановыми фазами. При этом гомологи могут, в отличие от разделяемых методами адсорбционной или нормально-фазной хроматографии, не иметь функциональных групп — обращенно-фазный сорбент может так же четко разделить гексан и гептан, бензол и толуол, фенол и *n*-крезол, *трет*-бутилтолуол и *трет*-амилтолуол. Это вовлекает в область анализа методом ВЭЖХ такие важные объекты, как углеводороды нефти, продукты нефтепереработки (бензины, керосины, газойли, смазочные масла, ароматические углеводороды), сланце- и углепереработки — очень важные многотоннажные продукты. Если нужно разделить вещества неполярные или малополярные, практически любой обращенно-фазный сорбент может при относительно простом подборе растворителя обеспечить почти идентичное разделение.

В настоящее время фирмы-производители выпускают разные обращенно-фазные сорбенты, перечень которых приведен в приложении 1.1. Как видно из этого перечня, практически все производители выпускают привитые фазы C_3 и C_{18} (последние нередко в нескольких вариантах), многие — C_1 - C_3 (что нередко обозначает одно и то же — прививку триметилхлорсилана, иногда диметилдихлорсилана), некоторые — фенил, C_4 или C_6 . Если плотность прививки фазы одинакова, то сорбент будет содержать для C_4 - фазы в 2 раза меньше, а для C_{18} - фазы более чем в 2 раза больше привитого углерода, чем фаза C_3 . На практике эта плотность несколько падает в ряду C_4 — C_8 — C_{18} , поэтому содержание углерода для C_4 несколько больше, а для C_{18} — меньше, чем можно было ожидать. Так как удерживание соединений в обращенно-фазной хроматографии пропорционально содержанию привитого углерода (точнее, той части привитого углерода, которая доступна для взаимодействия с молекулами разделяемых веществ), то для сорбентов, одной торговой марки удерживание увеличивается в ряду C_2 — C_4 — C_8 — C_{18} . Однако если взять сорбенты разных производителей, то заранее ничего сказать нельзя: нередко в таком случае сорбент с C_8 -фазой удерживает не слабее, а сильнее, чем с фазой C_{18} , выпускаемой другой фирмой.

Наряду с неполярными привитыми фазами, выпускаемыми специально для обращенно-фазной хроматографии, в обращенно-фазном варианте часто используют нитрильную и аминную привитые фазы, а иногда и диольную. В этом случае они работают и разделяют вещества в основном по обращенно-фазному механизму, как имеющие короткий (C_3) привитой алкилсилан, а полярные группы или не участвуют в

разделении, или играют второстепенную роль, несколько меняя селективность для ряда веществ определенной химической структуры.

В качестве растворителей для обращенно-фазной ВЭЖХ используют преимущественно метанол и ацетонитрил. Другие спирты, кроме метанола, используют редко, так как их вязкость значительно выше и при работе возникает слишком большое давление, а эффективность падает вследствие затрудненной диффузии в подвижной фазе. Тетрагидрофуран также используют значительно реже, во-первых, из-за нестабильности при хранении (он быстро окисляется, накапливая гидропероксиды, которые уменьшают диапазон УФ-пропускания, способны окислять привитую фазу и взрывоопасны), во-вторых, из-за трудности очистки перегонкой (необходимо разрушать пероксиды до перегонки во избежание взрыва).

Ацетонитрил имеет ряд преимуществ перед метанолом. При хорошей очистке он лучше пропускает в ближнем ультрафиолетовом диапазоне (ниже 210 нм) и позволяет работать в смеси вода — ацетонитрил при 200 и даже 190 нм. Он обычно обладает лучшими растворяющими свойствами для проб, чем метанол. При использовании смесей метанол — вода вязкость такой смеси не является аддитивной величиной (так же как и для смесей ацетонитрил — вода) и при 25 °С меняется от 0,89 и 0,57 МПа·с (для чистых воды и метанола соответственно) до 1,4 (цифры для смеси ацетонитрил — вода соответственно 0,89, 0,43 и 0,98). Большая вязкость смесей метанол — вода по сравнению со смесями ацетонитрил — вода (почти в 1,5 раза) затрудняет использование колонок, заполненных частицами сорбента размером 3 и 5 мкм, при использовании водно-метанольных смесей. Точно так же при градиентном элюировании колонки, работающие с системой метанол — вода, подвергаются при равном расходе действию больших давлений и быстрее выходят из строя. Наконец, не малую роль играет и то обстоятельство, что метанол относится к группе особо опасных ядов, находящихся на строгом контроле и учете, тогда как ацетонитрил к этой группе не относится.

К недостаткам ацетонитрила, несколько ограничивающим его использование, относятся его довольно высокая стоимость (особенно высокочистых сортов, предназначенных для ВЭЖХ и УФ-спектроскопии), некоторая токсичность, требующая предосторожностей при работе, а также то, что его труднее, чем метанол, освободить от воды, так как он образует азеотропную смесь с водой. Это затрудняет его регенерацию из отработанного растворителя, что особенно важно при большом масштабе работы, например, при препаративной работе.

Особо следует сказать о качестве воды и о требованиях к ней. Вода, являющаяся в настоящее время одним из важнейших растворителей для ВЭЖХ, является как самым доступным, так и очень трудным для тщательной очистки растворителем. Если для изократических разделений, особенно при использовании не очень чувствительных шкал и работе не в ближнем УФ-диапазоне удастся обойтись бидистиллятом (не деионизированной водой!), то для градиентной работы и работы с высокочувствительными детекторами такого качества воды уже недостаточно. Деионизированная вода, как правило, не подходит для использования в ВЭЖХ: органические иониты, используемые для извлечения из нее неорганических ионов, дают воду с очень низкой проводимостью, однако очень заметно обогащенную органическими загрязнениями по сравнению с водой до деионизации. Удалить все органические соединения из воды очень трудно, особенно микроколичества — никакая перегонка или ректификация не помогают, так как вследствие образования азеотропных смесей отделить примеси органических соединений не удастся.

Существуют системы высокой очистки воды, осуществляющие деионизацию с последующим извлечением органических соединений адсорбентами, однако они достаточно дороги. Разработаны системы, позволяющие резко уменьшить содержание органических соединений в воде путем обработки ее мощным УФ-облучением, иногда с последующей обработкой адсорбентами. Эти системы дешевле, но не так универсальны. Наконец, существуют патроны, заполненные адсорбентом, рассчитанным на извлечение органических соединений из определенного объема воды (обычно из 15 л) — они доста-

точно недороги и удобны, позволяют получить ровно столько очищенной воды, сколько нужно для ближайшей работы. Высокоочищенная вода нестабильна при хранении, поэтому лучше ее использовать достаточно быстро и свежеприготовленную.

Как же поступить в том случае, если таких систем или патронов в распоряжении исследователя нет? Тогда следует взять наиболее чистую воду, имеющуюся в лаборатории, и пропустить ее через колонку, заполненную чистым обращенно-фазным сорбентом с привитой фазой C_{18} . Все органические примеси из воды будут сорбироваться в начале колонки, а чистая вода без примесей — накапливаться в сосуде. После пропускания определенного объема воды, зависящего от количества органических загрязнений в ней, колонку промывают чистым метанолом или ацетонитрилом, смывая загрязнения, после чего она снова готова к работе.

Возможны разные варианты такой очистки. Можно просто при использовании градиента высокого давления установить колонку с привито-фазным сорбентом C_{18} , желательнее не обладающую большим гидравлическим сопротивлением (с зернением 20 или 15 мкм), после насоса, подающего чистую воду, до смесителя. В этом случае колонка будет очищать ровно столько воды, сколько нужно для работы, и вода будет самая свежеочищенная. Можно использовать стеклянную колонку, наполнив ее более крупным препаративным сорбентом (например, 40 — 63 мкм), и подавать воду под гидростатическим давлением, получая столько воды, сколько нужно на день работы. Можно, наконец, использовать полупрепаративную или препаративную колонку для ВЭЖХ и качать воду насосом хроматографа, используя для очистки воды ночное время, когда аналитическая работа не нужна. Какой вариант удобнее, решает сам исследователь.

Работая в градиентном режиме с водно-метанольными и водно-ацетонитрильными растворами, всегда следует ежедневно дегазировать растворители наилучшим из возможных способов, особенно если используют градиент на стороне низкого давления. Никогда не будет лишним иметь на выходе из детектора клапан или гидравлическое сопротивление, поддерживающее в кювете детектора избыточное давление около 0,05 — 0,3 МПа. Это простое приспособление позволяет добиться того, что пузырьки воздуха, если они и образуются, образуются уже после такого клапана, за кюветой детектора, и не мешают работе.

2.2.3. Распределительная хроматография с нанесенными фазами

Этот вариант распределительной жидкостно-жидкостной хроматографии был одним из первых, примененных для ВЭЖХ. Однако в отличие от ГЖХ, где нанесение на носитель жидкой неподвижной фазы является наиболее популярным методом работы, обеспечивающим большую часть аналитических разделений, он не нашел в ВЭЖХ широкого применения и был вытеснен привито-фазными сорбентами. Тем не менее работы с его использованием проводят, и в некоторых случаях применение распределительной хроматографии с нанесенными фазами вполне оправдано.

Неподвижную фазу и растворитель обычно подбирают таким образом, чтобы они были практически взаимно нерастворимы. Это понятно, так как в противном случае нанесенная фаза будет быстро вымываться из колонки растворителем. Такими комбинациями фазы и растворителя являются, например, трис (цианэтокси) пропан и гексан, парафиновое масло и вода. Однако при работе с такими системами компоненты образца, как правило, обладают коэффициентами распределения близкими или к нулю, или к бесконечности, т.е. или элюируются с фронтом растворителя без разделения, или задерживаются в колонке бесконечно долго.

Методы нанесения неподвижной фазы могут быть разными. Фаза может быть растворена в подходящем растворителе с низкой температурой кипения и нанесена методом испарения, как это делают в ГЖХ. Фаза может быть нанесена непосредственно в виде жидкости или пара. В обоих случаях заполнение колонок представляет трудности, если частицы сорбента меньше 40 мкм и не могут быть использованы для заполнения «сухим» способом.

Более популярным является динамический метод нанесения неподвижной фазы. Он заключается в том, что носитель, например силикагель с размером частиц от 5 до 10 мкм, вносят в колонку обычным суспензионным способом. На колонку подают заданный объем раствора неподвижной фазы, потом прокачивают растворитель, насыщенный неподвижной фазой, до установления равновесия. Носитель в колонке равномерно покрывается неподвижной фазой, она находится в равновесии с насыщенным фазой растворителем. Такая система будет стабильной и не нуждается в восстановлении из-за уноса фазы. Насыщение растворителя фазой может проводиться в предколонке с той же фазой, устанавливаемой после насоса до инжектора и периодически заменяемой.

Недостатки распределительной хроматографии с нанесенными фазами следующие. Невозможно использовать градиентную ВЭЖХ из-за уноса фазы. Невозможно работать в препаративном режиме, так как собранные фракции, естественно, будут содержать заметное количество нанесенной фазы, остающейся в образце после упаривания растворителя. Трудно менять состав растворителя, так как при этом колонка длительно приходит в новое равновесное состояние с новым растворителем. Затруднено использование повышенных температур для анализа, так как растворимость неподвижной фазы при повышении температуры заметно возрастает. Растворитель, в который вводится проба, должен по составу быть максимально близким к подвижной фазе, иначе возможны частичный смыв неподвижной фазы, ложные пики и нарушение процесса хроматографии.

Несколько слов о носителе и его желательных характеристиках для распределительной хроматографии с нанесенными фазами. Он должен иметь достаточно большой объем пор, быть при этом прочным механически (допускать суспензионное заполнение колонки), иметь крупные поры и не очень большую поверхность. Наносимая фаза не должна быть высоковязкой, чтобы не было затрудненного массообмена и снижения эффективности разделения по этой причине.

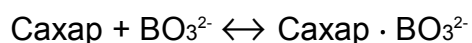
2.3. ИОНООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

2.3.1. Основы метода

В ионообменной хроматографии разделение компонентов смеси достигается за счет обратимого взаимодействия ионизирующихся веществ с ионными группами сорбента. Сохранение электронейтральности сорбента обеспечивается наличием способных к ионному обмену противоионов, расположенных в непосредственной близости к поверхности. Ион введенного образца, взаимодействуя с фиксированным зарядом сорбента, обменивается с противоионом. Вещества, имеющие разное сродство к фиксированному заряду, разделяются на анионитах или на катионитах. Аниониты имеют на поверхности положительно заряженные группы и сорбируют из подвижной фазы анионы. Катиониты соответственно содержат группы с отрицательным зарядом, взаимодействующие с катионами.

В качестве подвижной фазы используют водные растворы солей кислот, оснований и растворители типа жидкого аммиака, т.е. системы растворителей, имеющих высокое значение диэлектрической проницаемости ϵ и большую тенденцию ионизировать соединения. Обычно работают с буферными растворами, позволяющими регулировать значение pH.

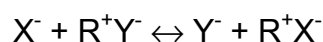
При хроматографическом разделении ионы анализируемого вещества конкурируют с ионами, содержащимися в элюенте, стремясь вступить во взаимодействие с противоположно заряженными группами сорбента. Отсюда следует, что ионообменную хроматографию можно применять для разделения любых соединений, которые могут быть каким-либо образом ионизированы. Можно провести анализ даже нейтральных молекул сахаров в виде их комплексов с борат-ионом:



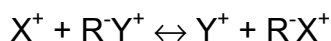
Ионообменная хроматография незаменима при разделении высокополярных веществ, которые без перевода в производные не могут быть проанализированы методом ГЖХ. К таким соединениям относятся аминокислоты, пептиды, сахара.

Ионообменную хроматографию широко применяют в медицине, биологии, биохимии [11—15], для контроля окружающей среды, при анализе содержания лекарств и их метаболитов в крови и моче, ядохимикатов в пищевом сырье, а также для разделения неорганических соединений, в том числе радиоизотопов, лантаноидов, актиноидов и др. Анализ биополимеров (белков, нуклеиновых кислот и др.), на который обычно затрачивали часы или дни, с помощью ионообменной хроматографии проводят за 20–40 мин с лучшим разделением. Применение ионообменной хроматографии в биологии позволило наблюдать за образцами непосредственно в биосредах, уменьшая возможность перегруппировки или изомеризации, что может привести к неправильной интерпретации конечного результата. Интересно использование данного метода для контроля изменений, происходящих с биологическими жидкостями [11]. Применение пористых слабых анионообменников на силикагелевой основе позволило разделить пептиды [12].

Механизм ионного обмена можно представить в виде следующих уравнений:
для анионного обмена



для катионного обмена



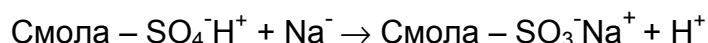
В первом случае ион образца X^- конкурирует с ионом подвижной фазы Y^- за ионные центры R^+ ионообменника, а во втором в конкуренцию с ионами подвижной фазы Y^+ за ионные центры R^- вступают катионы образца X^+ .

Естественно, что ионы образца, слабо взаимодействующие с ионообменником, при этой конкуренции будут слабо удерживаться на колонке и первыми вымываются с нее и, наоборот, более сильно удерживаемые ионы будут элюировать из колонки последними. Обычно возникают вторичные взаимодействия неионной природы за счет адсорбции или водородных связей образца с неионной частью матрицы или за счет ограниченной растворимости образца в подвижной фазе. Трудно выделить «классическую» ионо-обменную хроматографию в «чистом» виде, и поэтому некоторые хроматографисты исходят из эмпирических, а не теоретических закономерностей при ионообменной хроматографии.

Разделение конкретных веществ зависит в первую очередь от выбора наиболее подходящего сорбента и подвижной фазы. В качестве неподвижных фаз в ионообменной хроматографии применяют ионообменные смолы и силикагели с привитыми ионогенными группами.

Полистирольные ионообменные смолы для ВЭЖХ зернением 10 мкм и менее обладают селективностью и стабильностью, но сетчатая структура их, характеризующаяся расстоянием между узлами сетки 1,5 нм, что значительно меньше размера пор применяемого для адсорбционной хроматографии силикагеля (10 нм), замедляет массообмен и, следовательно, значительно снижает эффективность. Применяемые в ВЭЖХ ионообменные смолы представляют собой в основном сополимеры стирола и дивинилбензола. Обычно добавляют 8—12% последнего. Чем больше содержание дивинилбензола, тем больше жесткость и прочность полимера, выше емкость и, как правило, селективность и тем меньше набухаемость.

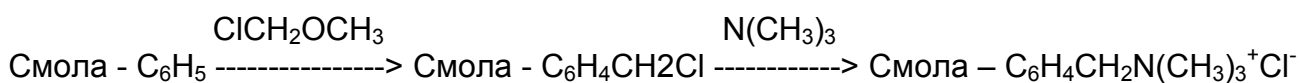
Катиониты получают сульфированием матрицы. Протон, ионно связанный с сульфогруппой, может перемещаться и даже уходить за пределы смолы в раствор. При этом чтобы молекула была в целом электронейтральной, место протона занимает положительно заряженный ион, который из раствора переходит в смолу. Например, при действии Na^+Cl^- на катионо-обменную смолу в H^+ -форме происходит реакция обмена:



Если реакция протекает до конца, то смола находится в натриевой (ионной) форме.

Анионообменные смолы получают хлорированием матрицы и последующим алкилированием алифатическим амином.

Наиболее распространены аниониты, имеющие четвертичные аммонийные группы, полученные при алкилировании триметиламино:



В этих смолах подвижен анион хлора, который может замещаться другим анионом, например OH^- . Катиониты обычно поставляются в H^+ -форме или Na^+ -форме, а аниониты — в OH^- -форме или Cl^- -форме. Таким образом указывается противоион ионо-обменника. Полученные материалы, содержащие сульфатные или триалкиламмонийные группы, являются сильными катионообменниками и сильными анионообменниками и называются соответственно SCX и SAX. Слабые катионообменники и анионообменники получают на основе карбоксилата COO^- или амина NH_3^+ соответственно. Существуют также жидкие органические ионообменники — неомешивающиеся с водой жидкости, физически нанесенные на пористые или поверхностно-пористые материалы. Жидкие анионообменники — высокомолекулярные амины или их соли, а катионообменники — эфиры фосфорной или фосфиновых кислот.

Для улучшения условий разделения в ионообменной хроматографии иногда получают лигандные комплексы ионов, изменяя при этом их полярность

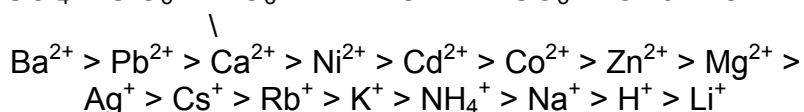


и делят на анионообменном носителе анионы железа. Так как селективность смолы зависит от характера противоиона, часто необходимо изменить форму смолы. Противоионы связаны кулоновскими силами взаимного притяжения с ионообменными группами и экранируют их заряд. Это притяжение зависит от физической природы противоиона, размеров, формы, плотности электронных оболочек. Одни противоионы при равенстве концентраций могут вытеснять другие из связи с ионными группами ионообменника. Ниже приведены ряды противоионов в порядке убывающей активности и уменьшения сродства к ионообменной смоле:

для анионов



для катионов

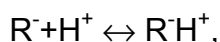


Знать эти ряды полезно для выбора системы элюирования. Наиболее быстрый метод превращения анионита в форму, которая в ряду селективности стоит выше исходной, состоит в промывании ее четырехкратным объемом 1 M раствора соответствующей соли. Если для работы необходима форма слабее исходной, то ее сначала переводят в гидроксильную форму, промывая 20-кратным количеством 1 M раствора NaOH, а затем уже превращают в нужную форму. Катиониты переводят в требуемую форму промыванием 1 M раствором нитрата соответствующего металла.

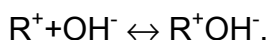
При изменении ионной формы смолы или в присутствии органических растворителей, таких, как ацетонитрил, тетрагидрофуран, может изменяться и объем смолы. Если смола уменьшается в объеме, упаковка в колонке оседает и образуется мертвый объем наверху колонки. Это оседание сопровождается потерей эффективности. Если смола набухает и упаковка в колонке увеличивается, то возрастает сопротивление в колонке, значительно уменьшает скорость потока и может даже привести к разрушению

сорбента. Невысокая стабильность ионогенных материалов является одним из недостатков ионообменной хроматографии, причем анионообменники менее стабильны, чем катионообменники. Для увеличения срока службы колонок используют предколонки, а также регенерацию колонок сильным растворителем. Катиониты, например, регенерируют обрабатывая 1 M азотной кислотой и продолжительно промывая той подвижной фазой, которая будет использована.

Ионообменники характеризуются степенью набухания и емкостью. Степенью набухания называют объем упакованного в колонну обменника (в мл), приходящийся на 1 г его в сухом виде, и имеет размерность мл/г. Максимальное количество ионов, которое может связать ионообменник, определяет его емкость, которая совпадает с концентрацией ионогенных групп. Ёмкость выражается числами ммоль эквивалентов обменяемого иона на 1 г сухого обменника (ммоль экв/г) или на 1 мл упакованного в колонну набухшего ионообменника (ммоль экв/мл) при значениях pH, соответствующих его полной ионизации. Для высокомолекулярных ионов или амфолитов, например белков, вводят понятие «эффективная» емкость, которая зависит от размера молекулы амфолита, расстояния между ионогенными группами и степени доступности всего объема пористой матрицы обменника для этих молекул. Понятия емкости и эффективной емкости могут не совпадать. Иногда приходится снижать полезную емкость сорбента за счет изменения pH, увеличивая при этом его эффективную емкость. Катионообменные смолы имеют емкость около 4,4 ммоль экв/г, а анионообменные — 3,5-4 ммоль экв/г для гелеобразной структуры и 2,5 ммоль экв/г для пористой. Обменная емкость изменяется при изменении pH. При низких pH происходит нейтрализация катионита при добавлении протона:



а при высоких pH подобным образом при действии щелочи нейтрализуются аниониты:



Этот эффект зависимости обменной емкости от pH для сильных и слабых ионообменников показан на рис. 2.11. Поскольку ионообменная емкость сильных катионитов падает до нуля при низких pH, они не могут быть использованы при $pH < 1$. Сильные аниониты должны применяться при $pH < 11$, слабые катиониты при $pH > 6$, а слабые аниониты при $pH < 8$. Из рисунка видно, что сильные ионообменники могут быть использованы в более широком диапазоне pH, чем слабые. Этим объясняется широкое применение сильных ионитов, на которых может быть разделено большее количество веществ разных классов одновременно, особенно если используется градиентное изменение pH. Сильно удерживаемые вещества, нестойкие при крайних значениях pH, могут разделяться на

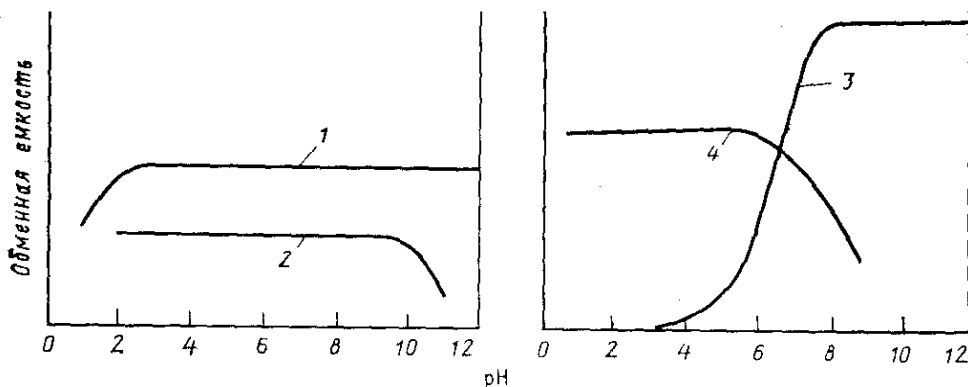


Рис. 2.11. Зависимость емкости ионообменных смол от pH: 1—сильный катионообменник; 2—сильный анионообменник; 3—слабый катионообменник; 4—слабый анионообменник

слабых ионитах. Еще раз подчеркнем, что сильные иониты полностью ионизированы в диапазоне $pH=2-11$. Слабые иониты полностью ионизированы в ограниченной области pH , и их ионизацией можно управлять, меняя pH элюента в пределах диапазона рабочих значений pH .

Таким образом, к категории слабых могут быть отнесены ионообменники, значительно отличающиеся друг от друга. Для них характерно не только сужение рабочего диапазона pH , но и уменьшение прочности сорбции вещества внутри этого диапазона. Слабым ионообменникам, в частности анионитам с замещающими группами диэтиламиноэтила (ДЕАЕ), отдадут предпочтение в тех случаях, когда необходимо элюирование в мягких условиях, например, при разделении белков и пептидов.

Наибольший интерес в качестве сорбентов для ионообменной хроматографии представляет химически модифицированный силикагель, получаемый прививкой к силикагелю

Таблица 2.1. Характеристика модифицированных силикагелей и ионообменных смол

Характеристика	Силикагель	Смола (сополимеры полистирола с дивинилбензолом)
Типичный диаметр частицы в мкм	5-10	7-10
Типичная ионообменная емкость, в мэкв/г	0,5-2	3-5
Стойкость к деформации давлением	Очень хорошая	От удовлетворительной до плохой (в зависимости от степени сшивки)
Форма	Сферическая или неправильная	Сферическая
Перепад давления на колонке	Высокий	Очень высокий
Эффективность	Высокая	Низкая
Метод набивки	Суспензионный	Суспензионный
Диапазон pH	2-7,5	0-12 (анионообменные) 0-14 (катионообменные)
Скорость регенерирования	Умеренная	Медленная

ионогенных групп. Применение этих материалов значительно увеличивает стабильность работы колонок, в которых не происходит изменения эффективности. Однако сильно-кислые или сильноосновные среды ($2 < pH < 7,5$) могут воздействовать на силикагель, выводя из строя колонку. Привитые к силикагелю ионообменники могут быть нестабильны при действии органических растворителей, концентрированных буферных растворов, высоких температур. Ионообменные силикагели зернением 10 или 5 мм не набухают, не сжимаются, как смолы, и отличаются от них большим размером и доступностью внутренних пор как для ионов образца, так и для противоионов. Благодаря этому быстрее устанавливается массоперенос даже без повышения температуры и значительно возрастает эффективность сорбента.

Не существует слабых катионитов на основе силикагеля, так как при $pH < 8$ материал не ионизирован, а при $pH > 8$ разрушается подложка наполнительного материала. Сравнительные характеристики модифицированных силикагелей и ионообменных смол, применяемых в ионообменной хроматографии, даны в табл. 2.1.

2.3.2. Выбор подвижной фазы и условий разделения

Подвижная фаза в ионообменной хроматографии должна обеспечивать растворимость различных солей и создание буферного раствора, необходимых для ионного обмена, контроль степени удерживания образца за счет использования растворителя нужной силы, получения необходимой селективности разделения.

Ионообменное, разделение обычно выполняют при применении водных растворов солей, которым придаются буферные свойства. Иногда добавляют в подвижную фазу небольшое количество смешивающихся с водой органических растворителей - метанола, этанола, ацетонитрила, тетрагидрофурана. Сила и селективность растворителя зависят от типа и концентрации буферных ионов и других солей, от значения pH и от вида и концентрации добавленных органических растворителей.

Удерживание в ионообменной хроматографии зависит от двух процессов: распределения образца между водной подвижной фазой и органической неподвижной и образования ионных пар (т.е. анионного или катионного обмена), причем последний процесс доминирует.

Распределение вещества между фазами зависит от силы электростатического взаимодействия заряженных ионизированных групп вещества с заряженными группами ионообменника. Некоторые гидрофобные соединения или вещества, способные образовывать водородные связи, могут взаимодействовать с материалом матрицы неспецифически.

Степень удерживания образца снижается с увеличением ионной силы подвижной фазы и увеличивается с увеличением ионообменной емкости сорбента. Ионная сила подвижной фазы возрастает при возрастании концентрации буфера и сохранении неизменным pH или при добавлении соли. Важна также концентрация буферных растворов, так как в растворе наблюдается конкуренция между ионами образца и буфера. Уменьшение концентрации буферного раствора увеличивает сродство смолы к образцу, что приводит к увеличению времени удерживания. Концентрация буферного раствора колеблется от 0,001 до 6 моль/л, причем верхняя граница определяется растворимостью соли, используемой в качестве буфера, а нижняя — самой буферной силой, так как в слабом буферном растворе нельзя контролировать уровень pH. Сильных буферных растворов также следует избегать, так как возможно выпадение осадка и забивание колонок. Сила растворителя зависит от типа противоиона, причем степень удерживания образца увеличивается в ряду, обратном ряду активности ионов, приведенному выше.

При анализе pH раствора выбирают таким образом, чтобы молекула образца была полностью ионизирована, обычно для кислот $pH \approx pK_a + 1,5$, а для оснований $pH \approx pK_a + 1,5$. Изменение pH подвижной фазы влияет на удерживание образца. Оно с повышением pH увеличивается при анионообменном разделении и уменьшается при катионообменном, т.е. происходит уменьшение силы растворителя при анионном и увеличение при катионном обмене. Особенно сильно влияет изменение pH раствора, происходящее вблизи значений pK_a образца.

В ионообменной хроматографии применяют следующие буферные растворы: ацетатный, фосфатный, цитратный, формиатный, аммиачный, боратный. Селективность разделения в ионообменной хроматографии зависит от концентрации и вида буферных ионов и органических растворителей, а также от pH среды. Ионообменное разделение проходит в пределах температур от комнатной до 60°C. Чем выше температура, тем меньше вязкость подвижной фазы и тем эффективнее разделение. Однако при высокой температуре стабильность колонки или образца может быть нарушена. Многие ионообменники выдерживают температуру до 60 °C, а некоторые полимерные катионообменники — даже до 80°C. Биохимические пробы принято разделять при низких температурах, часто при 4°C, хотя в современной ВЭЖХ при быстрых разделениях вероятность разрушения образца при 20-30°C резко снижается. Повышение температуры может привести к снижению k' для всех компонентов образца, а снижение ионной силы подвижной фазы может привести к обратному явлению.

Вводимые количества образца не должны превышать 5% суммарной ионообменной емкости. Так, для соединений с молекулярной массой 200-500 предполагается введение около 50 мг пробы на 1 г полимерного сорбента. Желательно, чтобы вводимый объем образца не превышал $\frac{1}{3}$ объема первого интересующего пика.

В подвижную фазу добавляют иногда органические растворители (метанол, этанол, ацетонитрил, диоксан), действие которых аналогично добавлению растворителей в обращенно-фазной хроматографии: при увеличении их количества степень удерживания образца снижается, и этот эффект более силен для менее полярных растворителей. Добавлением органических растворителей можно добиться также изменения селективности системы. Таким образом, снижают время удерживания в ионообменной хроматографии следующие факторы: 1) повышение температуры; 2) повышение концентрации буферного раствора; 3) снижение степени ионизации вещества за счет изменения pH.

2.3.3. Ионная хроматография

Особым видом ионообменной хроматографии, применяемым для анализа органических и неорганических ионов, не поглощающих в УФ-области, является ионная хроматография [16]. В этом методе ионообменное разделение ионов сочетают с кондуктометрическим определением их. Поскольку высокочувствительное кондуктометрическое определение возможно только при невысокой фоновой электропроводности потока жидкости, поступающей в детектор, фоновый электролит подвижной фазы предварительно удаляют пропуская его через ионообменные смолы.

Предложены два основных метода ионной хроматографии.

1. Двухколоночная ионная хроматография, основанная на компенсации (подавлении) электролита, содержащегося в элюенте для разделения смеси ионов на колонке с помощью второй ионообменной колонки, расположенной между детектором и разделительной колонкой. Этот метод и был ранее назван ионной хроматографией.

Принципиальная схема установки для анализа катионов показана на рис. 2.12. Вещества разделяются на катионообменной колонке 4 по ионообменному механизму, попадают в десорбционную колонку 5 со смолой в ОН-форме, где происходит нейтрализация подвижной фазы и удаление электролита из элюента. Анализируемые вещества выходят из колонки 5 в деионизированной воде и попадают в кондуктометрическую кювету 6. Сигнал с кондуктометра 7 поступает на самописец 8 или интегратор. На аналогичной установке анализируют анионы. Так как десорбционную колонку приходится часто регенерировать, отношение объемов, пропущенных через колонку 5, к объемам, допущенным через колонку 4, должно быть меньше или равно 10. Предложений схемы разделения для ионной хроматографии и варианты заполнения разделительной и десорбирующей колонок.

2. Другим вариантом ионной хроматографии является одноколоночная ионная хроматография, основанная на использовании электролита с невысокой электропроводностью. В этом случае компенсационная колонка отсутствует.

Метод подробно не рассматривается нами, так как имеется ряд неплохих обзоров по ионной хроматографии [17, 18].

Ионные хроматографы от простых до полностью автоматических выпускают фирмы «Даонекс корпорейшн», «Бекман» (США) и др. В СССР ионные хроматографы серийно выпускаются Джержинским ОКБА. Методом ион-хроматографии определяют неокрашенные анионы и катионы, находящиеся в образце в виде примесей, и микроколичества вредных веществ в воде, воздухе и биологических жидкостях.

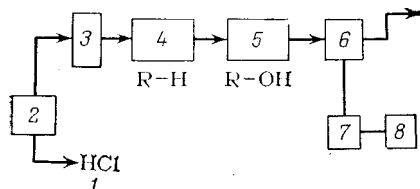


Рис. 2.12. Схема установки для анализа катионов методом ионной хроматографии: 1 — емкость с элюентом; 2 — насос; 3 — ввод пробы; 4 — разделительная колонка; 5 — десорбирующая колонка; 6 — кондуктометрическая кювета; 7 — кондуктометрический детектор; 8 — самописец

2.3.4. Практические рекомендации

Ионообменная хроматография в экспериментальном отношении — один из самых трудных видов ВЭЖХ, так как имеется много параметров, которые необходимо учитывать и контролировать.

Если анализ необходимо вести при pH ниже 2 или выше 7,5, то должна быть применена соответствующая анионная или катионная смола, а в остальных случаях — силикатель с привитой ионообменной смолой.

Для анализа молекул с молекулярной массой до 2000 применяют ионообменники с химически привитой фазой к силикагелю с размером частиц 5-10 мкм, а при препаративном разделении можно применять полимерные пористые сорбенты типа даррум ДА-Х8. При разделении крупных молекул с молекулярной массой 2000 применяют слабоосновный ионит, привитый на крупнопористый силикагель. Подробные сведения о наполнительных материалах приведены в разделе 5.6.

Скорость элюента обычно устанавливают 1 мл/мин, температуру 50°C или комнатную, если контроль температуры неудобен, а pH подбирают так, чтобы компоненты были ионизированы.

Так как в ионообменной хроматографии изотермы не параллельны, необходимо найти оптимальную для каждого частотного разделения температуру, изменяя ее с инкрементом 10°C. Обычно придерживаются середины найденного интервала оптимальных температур, контролируя ее с точностью 1°C.

Для создания определенного pH и поддержания на необходимом уровне готовят соответствующий буферный раствор. Если это возможно, то буферный раствор подбирают таким образом, чтобы его функциональная группа была похожа на функциональную группу образца. Так, ацетатный буферный раствор приемлем для анализа карбоновых кислот, фосфатный — для люирования нуклеотидов. Большое значение имеет чистота буферного раствора, так как он не должен детектироваться выбранным детектором, что особенно важно при работе в режиме градиентного элюирования. Чистота буферного раствора зависит от фирм-производителей, и даже разные партии одной фирмы могут различаться по составу. Каждая новая партия буферного раствора тестируется двумя холостыми хроматографическими опытами перед использованием. Второй опыт показывает, существуют ли вещества, отложившиеся в колонке в процессе регенерации или в течение последних стадий предыдущего градиента. Хотя большинство разделений проводят в водных буферных растворах, иногда добавляют органический растворитель (метанол, этанол) в количестве 3-10% для повышения селективности и улучшения растворимости образца. При этом концентрация растворителя не должна быть велика, чтобы не выдать осадения буферной соли, о чем будет свидетельствовать появление течи в системе и увеличение сопротивления в колонке.

рис. 2.13

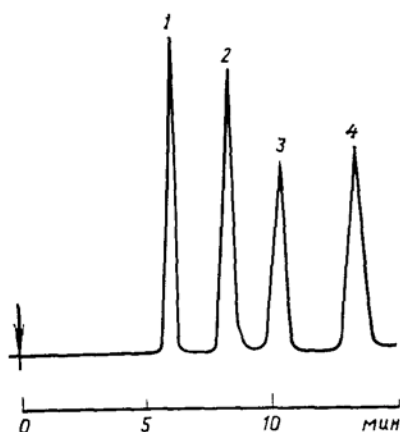


рис. 2.14

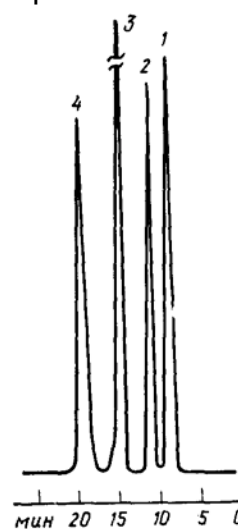


Рис. 2.13. Хроматограмма катехоламинов в плазме и тканях, полученная на жолонке размером 250X4,6 мм с нуклеосилом 5SA, подвижная фаза—аце-тат-цитратный буферный раствор (pH=5,2), содержащий 10% метанола, детектор—электрохимический (потенциал +0,7 В):

1 — норадреналин; 2 — адреналин; 3—допамин; 4—а-метилдопамин

Рис. 2.14. Хроматограмма неорганических анионов, полученная на колонке размером 250X4,6 мм с нуклеосилом 10 SB, подвижная фаза—0,03 М раствор салицилата натрия (pH=4,0), скорость потока 0,5 мл/мин, детектор— рефрактометр, проба 20 мкл: 1 — фосфат; 2 — хлорид; 3 — нитрат; 4 — сульфат

При работе в градиентном режиме желательно, чтобы к концу разделения ионная сила буферного раствора повышалась. Начиная работать с концентрации буферного раствора 0,1 М, так как оптимизация разделения при работе с низкими концентрациями (0,001 М) отнимает много времени. Если при этих условиях вещества не удастся удовлетворительно разделить, то дальнейшее улучшение разделения происходит за счет снижения концентрации буферного раствора, изменения pH или температуры шаговым методом, приводящих к повышению значений k' и увеличению времени удерживания.

Часто в буферный раствор для регулирования силы подвижной фазы добавляют нейтральные соли. Особой популярностью пользуется нитрат натрия, поскольку он не вызывает коррозии аппаратуры. Галогенид-ионы оказывают вредное влияние на нержавеющую сталь, и поэтому их лучше не применять.

Сравнивая сорбенты, предназначенные для ионообменной хроматографии, с сорбентами, применяемыми в других вариантах ВЭЖХ, можно отметить ряд недостатков у первых.

Применяемые в ионообменной хроматографии сорбенты менее эффективны и стабильны, а также менее воспроизводимы. Улучшить эффективность разделения ионогенных соединений можно, повысив температуру до 60 °С, изменив pH, добавив органический растворитель или перейдя от ионообменной хроматографии к работе в режиме ион-парной хроматографии или обращенно-фазной хроматографии с использованием метода подавления ионов.

Повышения стабильности достигают за счет очистки образца, уменьшения температуры и pH, снижения количества органических растворителей. Для рутинного анализа и лучшей воспроизводимости желательно использовать колонки, набитые в лаборатории.

Примеры разделения веществ на катионообменнике и анионообменнике приведены на рис. 2.13 и 2.14.

2.4. ЭКСКЛЮЗИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

2.4.1. Основные понятия

Эксклюзионная хроматография представляет собой вариант жидкостной хроматографии, в котором разделение происходит за счет распределения молекул между растворителем, находящимся внутри пор сорбента, и растворителем, протекающим между его частицами.

В отличие от остальных вариантов ВЭЖХ, где разделение идет за счет различного взаимодействия компонентов с поверхностью сорбента, роль твердого наполнителя в эксклюзионной хроматографии заключается только в формировании пор определенного размера, а неподвижной фазой является растворитель, заполняющий эти поры. Поэтому применение термина «сорбент» к данным наполнителям в определенной степени условно.

Принципиальной особенностью метода является возможность разделения молекул по их размеру в растворе в диапазоне практически любых молекулярных масс — от 10^2 до 10^8 , что делает его незаменимым для исследования синтетических и биополимеров.

По традиции процесс, проводимый в органических растворителях, все еще часто называют гель-проникающей, а в водных системах — гель-фильтрационной хроматографией. В данной книге для обоих вариантов принят единый термин, который происходит от английского «Size Exclusion» — исключение по размеру — и в наиболее полной степени отражает механизм процесса.

Детальный разбор существующих представлений о весьма сложной теории процесса эксклюзионной хроматографии проведен в монографиях [19—21]. Мы рассмотрим только принципиальные основы метода, достаточные для практической работы.

Объем эксклюзионной колонки можно выразить суммой трех слагаемых:

$$V_c = V_o + V_i + V_d,$$

где V_o — мертвый объем — объем растворителя между частицами сорбента (объем подвижной фазы); V_i — объем пор, занятый растворителем (объем неподвижной фазы); V_d — объем матрицы сорбента без учета пор.

Полный объем растворителя в колонке V_t (его часто называют полным объемом колонки, так как V_d не принимает участия в хроматографическом процессе) представляет собой сумму объемов подвижной и неподвижной фаз:

$$V_t = V_o + V_i.$$

Удерживание молекул в эксклюзионной колонке определяется вероятностью их диффузии в поры и зависит от соотношения размеров молекул и пор, что схематически показано на рис. 2.15. Коэффициент распределения K_d , как и в других вариантах хроматографии, представляет собой отношение концентраций вещества в неподвижной и подвижной фазах:

$$K_d = C_i / C_o.$$

Так как подвижная и неподвижная фазы имеют одинаковый состав, то K_d вещества, для которого обе фазы одинаково доступны, равен единице. Эта ситуация реализуется для молекул с самыми малыми размерами (в том числе и молекул растворителя), которые проникают во все поры (см. рис. 2.15) и поэтому движутся через колонку наиболее медленно. Их удерживаемый объем равен полному объему растворителя V_t .

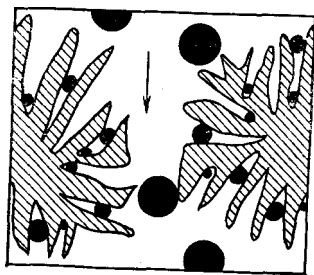


Рис. 2.15. Модель разделения молекул по размеру в эксклюзионной хроматографии

Все молекулы, размер которых больше размера пор сорбента, не могут попасть в них (полная эксклюзия) и проходят по каналам между частицами. Они элюируются из колонки с одним и тем же удерживаемым объемом, равным объему подвижной фазы V_0 . Коэффициент распределения для этих молекул равен нулю.

Молекулы промежуточного размера, способные проникать только в какую-то часть пор, удерживаются в колонке в соответствии с их размером. Коэффициент распределения этих молекул изменяется в пределах от нуля до единицы и характеризует долю объема пор, доступных для молекул данного размера. Их удерживаемый объем определяется суммой V_0 и доступной части объема пор:

$$V_R = V_0 + K_d V_i.$$

Отсюда следует еще одно существенное отличие эксклюзионной хроматографии: в данном методе разделение заканчивается до выхода пика растворителя, в то время как в других вариантах ВЭЖХ компоненты смеси элюируются после пика растворителя.

Параметр k' в эксклюзионной хроматографии обычно не используют. Его можно выразить уравнением

$$k' = K_d V_i / V_0.$$

Для большинства современных сорбентов $V_i \approx V_0$, поэтому $k' \approx K_d$.

Связь между удерживаемым объемом и молекулярной массой (или размером молекул) образца описывается калибровочной кривой (рис. 2.16). Каждый сорбент характеризуется своей калибровочной кривой, по которой легко оценить область разделяемых на нем молекулярных масс. Точка А соответствует пределу эксклюзии, или мертвому объему колонки V_0 . Все молекулы, масса которых больше, чем в точке А, будут элюироваться одним пиком с удерживаемым объемом V_0 . Точка В отражает предел проникания, и все молекулы, масса которых меньше, чем в точке В, также будут выходить из колонки одним пиком с удерживаемым объемом V_t . Между точками А и В располагается диапазон селективного разделения. Соответствующий ему объем $V_i = V_t - V_0$ часто называют рабочим объемом колонки. Отрезок CD представляет собой линейный участок калибровочной кривой, построенной в координатах $V_R - \lg M$. Этот участок описывается уравнением

$$V_R = C_1 - C_2 \lg M,$$

где C_1 — отрезок, отсекаемый на оси ординат продолжением отрезка CD, C_2 — тангенс угла наклона этого отрезка к оси ординат.

Величину C_2 называют разделительной емкостью колонки; ее выражают числом миллилитров растворителя, приходящегося на один порядок изменения молекулярной массы. Чем больше разделительная емкость, тем селективнее разделение в данном диапазоне масс. В нелинейных областях калибровочной кривой (участки AC и BD) в связи с уменьшением C_2 эффективность фракционирования заметно снижается. Кроме того, нелинейная связь между $\lg M$ и V_R существенно усложняет обработку данных и снижает точность результатов. Поэтому всегда нужно стремиться выбирать колонку (или набор колонок) так, чтобы разделение анализируемого полимера протекало в пределах линейного участка калибровочной кривой.

Если какое-либо вещество элюируется с удерживаемым объемом больше V_t , то это указывает на проявление других механизмов разделения (чаще всего адсорбционного). Адсорбционные эффекты обычно проявляются на жестких сорбентах, но иногда наблюдаются и на полужестких гелях, видимо, из-за повышенного сродства к матрице геля. Примером может служить адсорбция ароматических соединений на стирол-дивинилбензольных гелях.

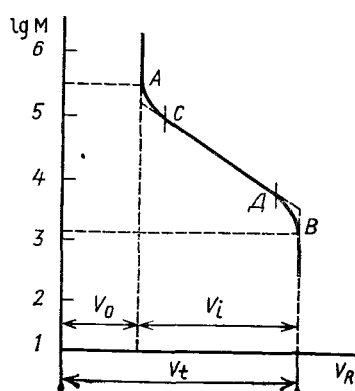


Рис. 2.16. Калибровочная кривая

Советские исследователи предложили теорию единого механизма жидкостной хроматографии полимеров на жестких гелях, из которой следует, что изменением параметров взаимодействия в системе полимер — сорбент — растворитель можно переходить от адсорбционного механизма к эксклюзионному и наоборот [22]. В общем случае в эксклюзионной хроматографии нужно стремиться полностью подавить адсорбционные и другие побочные эффекты, так как они, особенно при исследовании молекулярно-массового распределения (ММР) полимеров, могут существенно исказить результаты анализа.

Принципиальными отличиями эксклюзионной хроматографии от других вариантов являются заранее известная продолжительность анализа в конкретной используемой системе, возможность предсказания порядка элюирования компонентов по размеру их молекул, примерно одинаковая ширина пиков во всем диапазоне селективного разделения и уверенность в выходе всех компонентов пробы за достаточно короткий промежуток времени, соответствующий объему V_t . Хотя данный метод применяют, главным образом, для исследования ММР полимеров и анализа макромолекул биологического происхождения (белки, нуклеиновые кислоты и т.д.), указанные особенности делают его чрезвычайно перспективным для анализа низкомолекулярных примесей в полимерах и предварительного разделения проб неизвестного состава. Получаемая при этом информация существенно облегчает выбор наилучшего варианта ВЭЖХ для анализа данной пробы. Кроме того, микропрепаративное эксклюзионное разделение часто используют в качестве первого этапа при разделении сложных смесей путем комбинации различных видов ВЭЖХ.

Ограниченный диапазон коэффициентов распределения определяет и главный недостаток эксклюзионной хроматографии — заметно меньшее, чем в других вариантах ВЭЖХ, число пиков, которые могут быть полностью разделены на колонке заданной эффективности. Однако в последнее время благодаря успехам достигнутым в технологии изготовления высокоэффективных колонок, этот метод все шире применяют и для разделения малых молекул.

2.4.2. Особенности аппаратуры

Аппаратура для эксклюзионной хроматографии принципиально ничем не отличается от той, которую используют в других видах ВЭЖХ. Эксклюзионное разделение можно осуществить на любом жидкостном хроматографе, установив в него соответствующие колонки. Характеристики аппаратуры влияют главным образом на точность получаемых результатов. Специфичными для данного метода являются только некоторые детекторы и особые требования к системам обработки данных.

Из всех вариантов ВЭЖХ в эксклюзионной хроматографии полимеров предъявляются наиболее жесткие требования к стабильности потока подвижной фазы. Поэтому нужно использовать насосные системы с точностью подачи не хуже 0,3—0,5%. В лучших насосах, разработанных специально для данного метода, нестабильность скорости потока снижена до 0,1%.

Между дозатором и колонками весьма желательно устанавливать фильтр с минимальным мертвым объемом, так как забивание входного фильтра колонки при анализе полимеров происходит гораздо чаще, чем в других видах ВЭЖХ.

Точность результатов в эксклюзионной хроматографии полимеров заметно зависит от температуры. При ее изменении на 10 °С ошибка определения средних молекулярных масс превышает ±10% [23]. Поэтому в данном варианте ВЭЖХ термостатирование разделительной системы обязательно.

Дозатор и колонки обычно размещают в одном термостате. Как правило, достаточна точность поддержания температуры ±1 °С в пределах до 80—100 °С. В некоторых случаях, например, при анализе полиэтилена и полипропилена, рабочая температура составляет 135—150 °С. Необходимо также принимать меры для предотвращения заметных изменений температуры в линии, соединяющей колонку с детектором. При рабочих температурах до 40—50 °С и длине линии 5—8 см ее целесообразно изготавливать из фторопластового капилляра с наружным диаметром около 1,5 мм, внутренним — 0,3 мм. При более высоких температурах требуется термостатирование капилляра.

Наиболее распространенным детектором в эксклюзионной хроматографии полимеров является дифференциальный рефрактометр. При работе с этим детектором следует помнить, что в диапазоне примерно до $5 \cdot 10^3$ — $5 \cdot 10^4$ его сигнал зависит от молекулярной массы полимера. Поэтому при исследовании полимеров, содержащих значительное количество низкомолекулярных фракций, в процессе обработки результатов нужно вводить соответствующие поправки или, если это возможно, проводить специальную калибровку детектора. Из детекторов, разработанных специально для анализа полимеров, следует упомянуть вискозиметрический детектор и проточный лазерный нефелометр (детектор малоуглового лазерного светорассеяния). Эти детекторы в комбинации с рефрактометром или другим концентрационным детектором позволяют непрерывно определять молекулярную массу полимера в элюенте. При их использовании отпадает необходимость калибровки разделительной системы по исследуемому полимеру, но обработка информации может осуществляться только на ЭВМ. Вискозиметрический детектор, кроме того, является очень удобным прибором для исследования длинноцепной разветвленности синтетических полимеров.

Обычные электронные интеграторы, используемые в ВЭЖХ индивидуальных соединений, непригодны для обработки данных, получаемых при эксклюзионной хроматографии полимеров. Для этой цели используют мини-компьютеры, которые выполняют по специальным программам необходимые вычисления и выдают результаты опреде-

ления в виде средних молекулярных характеристик или кривых ММР. Современные приборы могут быть оснащены дополнительными устройствами для полной автоматизации анализа. Применение автоматических дозаторов в сочетании с мини-компьютером позволяет выполнять различные калибровки, выдавать в требуемой форме данные по ММР, проводить их статистический анализ без участия операторов.

Как отмечалось выше, в настоящее время анализ полимеров проводят в основном на обычной хроматографической аппаратуре. Однако существуют и специальные приборы, предназначенные преимущественно для определения ММР полимеров. К ним относится, в частности, микрогельхроматограф ХЖ-1309. Технические характеристики хроматографа приведены в приложении 14.6. Этот уникальный прибор оснащен высокочувствительным лазерным рефрактометром с вместимостью кюветы 0,1 мкл [24] и микроколонками диаметром 0,5 мм с эффективностью около 30 тыс. т. т./м. Продолжительность анализа составляет 5-10 мин, а расход растворителя — приблизительно 100 мкл на один анализ, что позволяет работать с особо дефицитными и сверхочищенными растворителями. Калибровку прибора и обработку результатов проводят на ЭВМ с пакетом программ, обеспечивающих выполнение любых расчетов, необходимых в эксклюзивной хроматографии полимеров.

2.4.3. Выбор сорбента

Выбор сорбентов, обеспечивающих оптимальные условия для решения конкретной аналитической задачи, проводят в несколько этапов. Первоначально на основе данных о химическом составе или растворимости анализируемых веществ устанавливают, какой вариант процесса следует применить — хроматографию в водных системах или в органических растворителях, что в значительной степени определяет тип необходимого сорбента. Разделение веществ низкой и средней полярности в органических растворителях можно успешно осуществить как на полужестких, так и на жестких гелях. Исследование ММР гидрофобных полимеров, содержащих полярные группы, чаще проводят на колонках со стирол-дивинилбензолными гелями, так как в этом случае практически не проявляются адсорбционные эффекты и не требуется добавка модификаторов к подвижной фазе, что значительно упрощает подготовку и регенерацию растворителя.

Для работы в водных системах используют главным образом жесткие сорбенты; иногда очень хорошие результаты удается получить на полужестких гелях специальных типов. Затем по калибровочным кривым или данным о диапазоне фракционирования, приведенным в гл. 4, выбирают сорбент нужной пористости с учетом имеющихся сведений о молекулярной массе образца. Если анализируемая смесь содержит вещества, отличающиеся по молекулярной массе не более чем на 2-2,5 порядка, то обычно удается разделить их на колонках с одним размером пор. При более широком диапазоне масс следует использовать наборы из нескольких колонок с сорбентами различной пористости. Ориентировочно калибровочную зависимость в этом случае получают сложением кривых для отдельных сорбентов.

На выбранных таким образом колонках выполняют пробный анализ и при необходимости вносят изменения в систему колонок для оптимизации разделения. Оптимизацию приходится проводить, если колонки не обеспечивают требуемого диапазона разделения или эффективности разделения.

Наиболее сложным является выбор системы колонок для разделения синтетических полимеров, имеющих широкое ММР. Обычно для этой цели применяли наборы из трех — пяти колонок, содержащих сорбенты с последовательно возрастающим размером пор (например, μ -стирогель 102+103+104+105 \oplus)*, области разделения которых перекрываются. При этом, как правило, получали калибровочную зависимость с линейным диапазоном около трех порядков и с достаточно большими криволинейными участками, а про-

* - Пояснение—см. разд. 4.5.1.

должительность анализа (при наиболее типичной скорости потока 1 мл/мин) составляла 40-45 мин. Главным недостатком данной калибровки является существенное ухудшение селективности разделения на криволинейных участках, что заметно снижает точность результатов. Кроме того, резко усложняется обработка экспериментальных данных. Поэтому особое значение имеет выбор такой разделительной системы, которая характеризуется линейной зависимостью логарифма молекулярной массы полимера от удерживаемого объема. В этом случае можно рассматривать хроматограмму как зеркальное отображение дифференциальной кривой ММР в логарифмическом масштабе.

В работе [25] предложен принцип бимодального распределения размеров пор, который позволяет составлять наборы колонок с значительно лучшими рабочими характеристиками. В соответствии с этим принципом, для составления набора колонок с линейной калибровочной зависимостью в широком интервале молекулярных масс нужно использовать только два сорбента с размерами пор, отличающихся на один-полтора порядка и имеющих умеренно узкое распределение пор по размеру. Разделительная емкость S_2 колонок с этими сорбентами должна быть примерно одинаковой. Полученные бимодальные наборы колонок, как правило, имеют линейный участок калибровочной кривой, перекрывающий около четырех порядков изменения молекулярной массы, и умеренную разрешающую способность. За счет сокращения числа колонок соответственно уменьшается продолжительность разделения. Так, бимодальные наборы, выпускаемые фирмой «Дюпон» и состоящие из колонок с зорбаксами PSM-60 и PSM-1000 длиной по 25 см, имеют линейную калибровку в диапазоне молекулярных масс от $2 \cdot 10^2$ до 10^6 и гарантированную эффективность не менее 20 000 т. т.

Дальнейшие исследования показали, что необходимое распределение пор сорбента по размерам, обеспечивающее линейную калибровку в любом заданном диапазоне молекулярных масс, в общем случае является мультимодальным и может быть рассчитано на ЭВМ [26].

Таким образом, имея несколько сорбентов разной пористости с известным распределением пор по размеру, можно рассчитать состав смешанного «линейного» сорбента.

Так, калибровочная зависимость тримодального сорбента на основе макропористых стекол [27] в диапазоне молекулярных масс от $2 \cdot 10^3$ до $4 \cdot 10^5$ имела значительно более высокую степень линейности, чем у бимодальных наборов, описанных в работе [25].

Линейные наборы можно составлять и из колонок с полужесткими гелями. В работе [25] приведен пример составления линейного набора из колонок с μ -стирогелями $500 \oplus$ и $10^5 \oplus$ в том случае, когда разделительная емкость первой колонки заметно меньше, чем второй. Полученная калибровочная зависимость представляет собой ломаную линию с точкой излома, соответствующей молекулярной массе около 20 000 (верхний предел селективного диапазона первой колонки). При подключении еще одной колонки с размером пор 500 Д разделительная емкость в диапазоне масс до 20 000 увеличилась примерно вдвое, а калибровочная зависимость набора стала практически линейной в диапазоне молекулярных масс от $5 \cdot 10^2$ до $2 \cdot 10^6$.

По мнению Йоу с сотр., колонки с жесткими гелями лучше подходят для сочетания в бимодальные наборы, так как свойства этих сорбентов более стабильны от партии к партии [25]. Однако следует отметить, что в последние годы качество колонок с полужесткими гелями и воспроизводимость их характеристик значительно улучшились. Отмечено, что современные полимерные сорбенты более однородны по размерам пор, чем сорбенты на основе силикагелей [28]. Опыт работы одного из авторов с колонками типа μ -сферогель показал, что соединение различных колонок требуемой пористости, взятых «через одну» (например, $5 \cdot 10^2 + 10^4 \oplus$ или $10^3 + 10^5 \oplus$), в большинстве случаев позволяет получить линейную калибровочную зависимость в диапазоне около 4 порядков.

Оптимизацию разделительной системы целесообразно рассмотреть на примере исследования образца, о котором не известно ничего, кроме растворимости (в воде или в органическом растворителе) [20]. Предварительное разделение образца проводят на бимодальном наборе колонок с широким диапазоном разделения. В зависимости от вида

получаемой хроматограммы (рис. 2.17) изменяют разделительную систему в соответствии с рекомендациями, приведенными ниже.

1. Набор оптимален.
2. Недостаточный диапазон разделения: имеются высокомолекулярные фракции, попадающие в область эксклюзии. Необходимо добавить колонку с более крупными порами.
3. Имеются фракции, попадающие в область эксклюзии; колонка II не участвует в разделении. Необходимо заменить ее на колонку с более крупными порами, чем у колонки I.

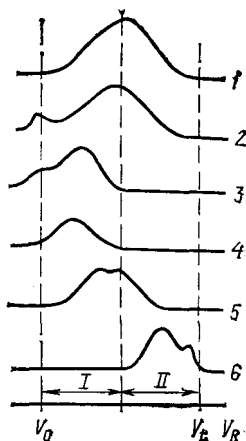


Рис. 2.17. Различные виды хроматограмм неизвестного образца: 1 — область разделения крупнопористой колонки; 2 — область разделения мелкопористой колонки

4. Колонка II не участвует в разделении. Следует использовать две колонки типа I.
5. Улучшение разделения можно получить на двух колонках со средним размером пор.
6. Недостаточная селективность разделения; колонка I не участвует в разделении. Следует использовать две колонки типа II.

Если в любом из рассмотренных вариантов необходимо повысить эффективность разделения, то следует удвоить число колонок, входящих в выбранный набор.

Описанный процесс оптимизации не учитывает особенностей, связанных с адсорбцией анализируемых веществ и другими побочными явлениями. Устранение адсорбции за счет модификации подвижной фазы рассмотрено ниже.

Для предотвращения специфических затруднений, возникающих при эксклюзионной хроматографии биололимеров, витаминов и различных лабильных соединений, в последнее время чаще всего используют сорбенты с привитой карбогидратной (типа диол) или эфирной фазой (μ -бондагель E) и полимерные сорбенты, предназначенные для работы в водных средах.

2.4.4. Выбор растворителя

Растворители, применяемые в эксклюзионной хроматографии, должны удовлетворять следующим основным требованиям:

- 1) полностью растворять образец при температуре разделения;
- 2) смачивать поверхность сорбента и не ухудшать эффективность колонки;
- 3) предотвращать адсорбцию (и другие взаимодействия) разделяемых веществ с поверхностью сорбента;
- 4) обеспечивать максимально высокую чувствительность детектирования;
- 5) иметь низкую вязкость и токсичность.

Кроме того, при анализе полимеров имеет существенное значение термодинамическое качество растворителя: весьма желательно, чтобы он был «хорошим» по отношению к разделяемому полимеру и матрице геля. Свойства, наиболее распространенных растворителей для эксклюзионной хроматографии приведены в приложении 2.

Растворимость образца обычно является главным лимитирующим фактором, ограничивающим ассортимент пригодных подвижных фаз. В приложении 3 указаны основные типы полимеров, которые целесообразно анализировать в тех или иных растворителях.

Наилучшим органическим растворителем для эксклюзионной хроматографии синтетических полимеров по комплексу свойств является тетрагидрофуран. Он обладает уникальной растворяющей способностью, низкой вязкостью и токсичностью, лучше многих других растворителей совместим со стирол-дивинил-бензолными гелями и, как правило, обеспечивает высокую чувствительность детектирования при использовании рефрактометра или УФ-детектора в области до 220 нм. Для анализа высокополярных и нерастворимых в тетрагидрофуране полимеров (полиамиды, полиакрилонитрил, полиэтилен-терефталат, полиуретаны и др.) обычно используют диметилформамид или *m*-крезол, а разделение полимеров низкой полярности, например различных каучуков и полисилоксанов, часто проводят в толуоле или хлороформе. Последний является также одним из лучших растворителей при работе с ИК-детектором. *o*-Дихлорбензол и 1,2,4-трихлорбензол применяют для высокотемпературной хроматографии полиолефинов (обычно при 135°C), которые в других условиях не растворяются. Эти растворители имеют очень высокий показатель преломления, поэтому иногда их целесообразно использовать вместо тетрагидрофурана для анализа полимеров с низким коэффициентом преломления, что позволяет повысить чувствительность при детектировании рефрактометром.

Для предотвращения окисления растворителей и полужестких гелей в условиях высокотемпературной эксклюзионной хроматографии к *o*-дихлорбензолу и 1,2,4-трихлорбензолу добавляют антиокислители — 1,3 г/л 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенола (алкофен БП, ионол) или 0,4 г/л 4,4'-тио-бис(6-*трет*-бутил-3-метилфенол) а (тиоалкофен БМ, сантонокс R).

Жесткие сорбенты совместимы с любыми подвижными фазами, имеющими pH < 8-8,5; при более высоких значениях pH силикагель начинает растворяться и колонка необратимо теряет эффективность. Стирол-дивинилбензолные гели совместимы в основном с элюентами умеренной полярности. Для работы на колонках с μ -стирогелем (от $10^3\oplus$ и выше), по данным фирмы «Уотерс», пригодны тетрагидрофуран, ароматические и хлорированные углеводороды, гексан, циклогексан, диоксан, трифторэтанол, гексафторпропанол и диметилформамид.

Степень набухания частиц геля в различных растворителях неодинакова, поэтому замена элюента в колонках с данными сорбентами может привести к снижению эффективности за счет изменения объема геля и образования пустот. При использовании неподходящих растворителей (ацетон, спирты) происходит столь сильная усадка геля, что колонка оказывается безнадежно испорченной. У сорбентов с малым размером пор (типа μ -стирогеля $100\oplus$ и $500\oplus$) такая усадка наблюдается как в полярных, так и в неполярных растворителях, поэтому с ними, кроме того, нельзя работать в насыщенных углеводородах, фторированных спиртах и диметилформамиде. Удобным, хотя и весьма дорогим выходом из положения является использование отдельных наборов колонок для каждого применяемого растворителя. Некоторые фирмы с этой целью выпускают колонки с одним и тем же размером пор, заполненные разными растворителями — тетрагидрофураном, толуолом, хлороформом и диметилформамидом.

Для предотвращения усадки геля рекомендуется следующий способ замены растворителя: колонку, содержащую растворитель А, присоединяют к насосу, устанавливают скорость потока растворителя А 0,3-0,5 мл/мин, проводят градиентное изменение состава элюента от 0 до 100% растворителя В со скоростью 1%/мин и промывают с той же скоростью растворителем В в течение 1,5-2ч. Резкое изменение полярности растворителя почти всегда приводит к ухудшению характеристик колонки, и его лучше вообще избегать. Если такая замена все же необходима, то следует использовать промежуточный растворитель. Так, толуол сначала заменяют на тетрагидрофуран и через 1-2 дня — на диметилформамид. Падение эффективности при этом будет меньше, чем при одностадийной замене растворителя. В любом случае замена подвижной фазы в высоко-

эффективных колонках с полужесткими гелями остается весьма деликатной операцией, требующей особой осторожности. В принципе возможно приготовление таких колонок и для работы с полярными растворителями. Нужный растворитель при этом используют при набивке колонки. Однако вследствие малой набухаемости гелей в этих растворителях получаемые колонки обычно имеют более низкую эффективность.

При разделении макромолекул основной вклад в размывание полосы определяется затрудненной массопередачей. К сожалению, многие из применяемых элюентов имеют высокую вязкость. Для снижения вязкости (а также для улучшения растворимости) эксклюзионную хроматографию часто проводят при повышенных температурах, что существенно улучшает эффективность хроматографической системы.

Анализ большинства полимеров на жестких гелях часто осложняется их адсорбцией. Для подавления адсорбции обычно используют растворители, которые адсорбируются на насадке колонки сильнее, чем анализируемые вещества. Если по каким-либо причинам это невозможно, то подвижную фазу модифицируют добавкой 0,1-2% полярного модификатора, например тетрагидрофурана [29]. Значительно более сильными модификаторами являются этиленгликоль и полигликоли с различной молекулярной массой (ПЭГ-200, ПЭГ-400, карбовакс 20 М) [30]. Иногда, например при анализе поликислот в диметилформамиде, требуется добавка достаточно сильных кислот [31]. Следует отметить, что полностью устранить адсорбцию добавкой модификаторов удается не всегда. В таких случаях нужно использовать полужесткие гели [32, 33]. Некоторые полимеры хорошо растворяются только в высоко полярных растворителях (ацетон, диметилсульфоксид и т. п.), несовместимых со стирол-дивинилбензолными гелями. При их разделении на жестких сорбентах выбор растворителя проводят в соответствии с общими принципами, изложенными выше.

Иная ситуация имеет место при проведении эксклюзионной хроматографии в водных средах. Из-за специфических особенностей многих разделяемых систем (белки, ферменты, полиэлектролиты и др.) и разнообразия применяемых сорбентов существует очень много вариаций состава подвижной фазы для подавления различных нежелательных эффектов [34, 35]. Общими приемами модификации является добавка различных солей и применение буферных растворов с определенным значением pH. В частности, поддержание $\text{pH} \leq 4$ дает возможность подавить слабую ионообменную активность силикагелей, обусловленную присутствием на их поверхности кислых силанольных групп. Требуемая ионная сила подвижной фазы достигается при концентрации буферного раствора 0,05-0,6 М; оптимальную концентрацию подбирают экспериментально. Для предотвращения ионообменной сорбции катионных соединений наиболее часто используют такой активный модификатор, как тетраметиламмонийфосфат при $\text{pH} \approx 3$. Однако при разделении некоторых белков могут проявляться гидрофобные взаимодействия, в свою очередь осложняющие эксклюзионный механизм разделения. Те же эффекты иногда проявляются и при работе с дезактивированными гидрофильными сорбентами. Для их устранения к растворителю добавляют метанол. Иногда в водную подвижную фазу вводят полярные органические растворители, полигликоли, кислоты, основания и поверхностно-активные вещества.

2.4.5. Исследование полимеров

Важнейшей областью применения эксклюзионной хроматографии является исследование высокомолекулярных соединений. Применительно к синтетическим полимерам этот метод за короткий срок занял главенствующее положение для определения их молекулярно-массовых характеристик и интенсивно используется для изучения других видов неоднородности. В химии биополимеров эксклюзионную хроматографию широко применяют для фракционирования макромолекул и определения их молекулярной массы.

В данном разделе основное внимание уделено специфическим особенностям эксклюзионной хроматографии синтетических и некоторых природных полимеров, так как при анализе биополимеров, представляющих собой в большинстве случаев индиви-

дуальные макромолекулы, отсутствуют затруднения, связанные с неоднородностью веществ по молекулярной массе. Здесь также не рассматриваются особенности высокоэффективного эксклюзионного разделения олигомеров, так как они детально описаны в монографиях [21, 36].

Принципиальное отличие эксклюзионной хроматографии высокомолекулярных синтетических полимеров заключается в невозможности разделения смеси на индивидуальные соединения. Эти вещества представляют собой смесь полимергомологов с различной степенью полимеризации и соответственно с разными молекулярными массами M_i . Молекулярную массу таких смесей можно оценить некоторой средней величиной, которая зависит от способа усреднения. Содержание молекул каждой молекулярной массы M_i определяют либо по их численной доле в общем числе полимерных молекул, либо по массовой доле в их общей массе. Обычно полимер характеризуют найденными этими способами средними величинами, которые называют соответственно среднечисленной M_n и среднемассовой M_w молекулярной массой. Значения M_n дают, например, криоскопия, осмометрия, эбулиоскопия, а значения M_w — светорассеяние и ультрацентрифугирование.

Если обозначить число молекул с молекулярной массой M_i через N_i , то общую массу полимера можно выразить $\sum M_i N_i$, численную долю молекул с массой M_i — $N_i / \sum N_i$, а массовую долю молекул с массой M_i — $f_i = M_i N_i / \sum M_i N_i$. Чтобы определить часть общей массы полимера, соответствующую этим долям, их умножают на M_i .

Просуммировав полученные значения для всех величин i , получают средние молекулярные массы:

$$M_n = \frac{\sum M_i N_i}{\sum N_i} = \frac{1}{\sum (f_i / M_i)}$$

Отношение M_w / M_n характеризует полидисперсность полимера.

В практической работе часто определяют молекулярную массу полимеров методом вискозиметрии. Средневязкостную молекулярную массу находят по уравнению Марка — Куна — Хаувинка:

$$[\eta] = K_\eta M_\eta^a$$

где $[\eta]$ — характеристическая вязкость; K , a — константы для данной системы полимер — растворитель при данной температуре.

Величина M_η описывается уравнением

$$M_\eta = (\sum M_i^a f_i)^{1/a}$$

Как правило, величины средних молекулярных масс удовлетворяют неравенству $M_w > M_\eta > M_n$.

Обычно полимерный образец характеризуют комплексом значений M_w , M_n и M_w / M_n , но этого может быть недостаточно. Наиболее полную информацию о молекулярно-массовой неоднородности образца дают кривые ММР.

Типичная хроматограмма, полученная в процессе эксклюзионного разделения, представляет собой достаточно плавную кривую с одним (в случае унимодального ММР) или несколькими максимумами. Из этой кривой с использованием калибровочной зависимости и соответствующих расчетов определяют значения средних молекулярных характеристик и ММР полимера в дифференциальной или интегральной форме.

2.4.5.1 Влияние различных факторов на результаты эксперимента

Стабильность и скорость подачи растворителя. В высокоэффективной эксклюзионной хроматографии погрешность определения молекулярных масс примерно на порядок выше, чем погрешность подачи растворителя [37, 38]. В современных насосах с электронным управлением при ежедневной установке расхода далеко не всегда удается получить одну и ту же скорость подвижной фазы; при обычно используемой скорости потока 1 мл/мин погрешность установки в 0,01 мл/мин составляет один процент, что приведет к ошибке определения молекулярных масс около 10%. Это обстоятельство вызывает необходимость в тщательном ежедневном контроле скорости растворителя. Точность установки расхода проверяют специальными расходомерами или по времени выхода выбранного стандартного вещества.

Практически полностью устранить ошибки, связанные с воспроизводимостью установки расхода, позволяет метод внутреннего стандарта. В этом методе к анализируемым пробам добавляют некоторое количество индивидуального соединения, которое элюируется из колонки после выхода полимера и не накладывается на пики низкомолекулярных примесей [39, 40]. При изменении скорости потока отношение параметров удерживания полимера и стандарта остается постоянным.

Время удерживания полимерных фракций определяют по формуле

$$t_R = t_R' (t_s / t_s'),$$

где t_R , t_s — время удерживания фракции полимера и стандартного соединения по калибровке; t_R' и t_s' — те же параметры, измеренные по хроматограмме.

В работе [39] в качестве очень удобного стандартного вещества предложено применять элементную серу, которая растворяется во многих растворителях и хорошо детектируется УФ-детектором и рефрактометром.

В хроматографических процессах, согласно уравнению Ван-Деемтера, существует оптимальная скорость потока, при которой колонка имеет наиболее высокую эффективность. Для большинства эксклюзионных колонок с размером частиц 10 мкм она составляет около 1 мл/мин. При повышении скорости потока ВЭТТ возрастает, главным образом, за счет удешевления массообмена. В эксклюзионной хроматографии этот процесс выражен наиболее резко, так как коэффициенты диффузии сильно снижаются при повышении молекулярной массы. Отсюда также следует, что снижение эффективности в наибольшей степени наблюдается для высокомолекулярных фракций.

Так, для полистирольного стандарта с $M=39 \cdot 10^4$ эффективность набора колонок с жесткими гелями при увеличении расхода от 1 до 2 мл/мин снижается примерно в полтора раза, а для толуола — практически не меняется.

Температура. Обычно эксклюзионное разделение проводили при 20-25°C, часто без термостатирования. Некоторые труднорастворимые полимеры (полиэтилен, полипропилен, полиамиды и др.) анализируют при 135-150°C. Повышение температуры широко применяют для снижения вязкости растворителей, так как при этом увеличиваются коэффициенты диффузии и, следовательно, эффективность колонок. В связи с тем, что этот эффект сильнее проявляется для самых высокомолекулярных фракций, даже небольшое повышение температуры анализа позволяет улучшить разделение именно в той области, где оно наименее эффективно. Поэтому целесообразно работать при повышенных температурах (40-50°C вместо комнатной температуры) и в тех случаях, когда подвижная фаза имеет низкую вязкость. Некоторые полужесткие гели для эксклюзионной хроматографии в водных средах (например, ОН-пак и ион-пак) рекомендуется использовать при 40-80°C, так как в этих условиях они имеют максимальную разрешающую способность.

Термостатирование колонок ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) существенно повышает точность результатов.

Гидродинамические объемы макромолекул полистирола, а следовательно, и их удерживаемые объемы зависят от растворителя и температуры. Показано [41], что они увеличиваются на 10% при изменении температуры от 25 до 35°C в толуоле и от 45 до 35°C

— в хлороформе. Определены температурные интервалы, в которых данными изменениями можно пренебречь: 25-50°C для тетрагидрофурана, 20-30°C и 45-55°C — для хлороформа и 35-65 °C — для толуола. Эти интервалы рекомендованы авторами для практической работы.

Размер и вязкость пробы. Эксклюзионные колонки очень чувствительны к перегрузке пробой. Максимальная масса полимера, которую можно вводить в колонку, составляет 0,1-0,5 мг на 1 г сорбента. При работе с наиболее часто применяемыми колонками диаметром 7-8 мм и длиной 50-60 см масса образца, как правило, не должна превышать 3-5 мг.

При большей нагрузке возрастают объемы удерживания и падает эффективность колонки. Образцы всегда желательно растворять в растворителе, который в данный момент используют в качестве подвижной фазы. Концентрация полимера в растворе должна быть достаточно низкой, чтобы уменьшить вязкость пробы и избежать проявления межмолекулярных взаимодействий полимера в растворе. Допустимые значения концентрации полимеров в зависимости от их молекулярной массы при разделении на колонках с μ -стирогелем, рекомендуемые фирмой «Уотерс», должны быть следующие:

Молекулярные массы	<20000	30000—200000	400000—2000000	>2000000
Концентрация, % (масс). . . .	0,25	0,1	0,05	0,01

Соблюдение указанных концентраций особенно важно для анализа полимеров с узким ММР, в частности, для калибровочных стандартов. Увеличение вязкости анализируемого раствора приводит к резкому ухудшению разделения и занижению найденных молекулярных характеристик полимера. Принято считать, что вязкость пробы может превышать вязкость подвижной фазы максимум в два раза [20].

При анализе низкомолекулярных веществ ($M < 3000$) и полимеров с широким диапазоном ММР можно использовать более высокие концентрации.

Типичные значения объема пробы в эксклюзионной хроматографии лежат в пределах 25-300 мкл. Естественно, что при большей дозе возрастает размывание полосы. Как правило, объем пробы должен быть менее 1/3 объема, занимаемого в колонке индивидуальным низкомолекулярным соединением, элюирующимся из колонки в зоне полного проникания. Этот объем легко определить по ширине его пика у основания. Однако если чувствительность детектора недостаточна и приходится увеличивать массу образца, то нужно увеличивать объем пробы, а не концентрацию, так как в этом варианте ухудшение характеристик колонки будет заметно меньше.

Для получения надежных и воспроизводимых результатов определения ММР концентрационные эффекты должны быть устранены в максимально возможной степени. Поэтому в каждом отдельном случае нужно экспериментально определять допустимую массу образца, концентрацию и объем дозируемого раствора полимера, при которых еще не искажаются характеристики удерживания, выбрать оптимальные значения и выдерживать их во всех анализах.

2.4.5.2. Разрешающая способность и эффективность томографической системы

Разрешающую способность хроматографических методов принято оценивать коэффициентом разрешения (см. гл. 1):

$$R_S = \frac{1}{4} [(\alpha - 1) / \alpha][k' / (1 + k')] \sqrt{N}$$

где три сомножителя характеризуют соответственно селективность, емкость и эффективность колонки; k' — среднее значение для двух разделяемых компонентов.

В связи с тем, что коэффициент распределения K_d может изменяться только в пределах $0 < K_d < 1$, а для современных сорбентов $k' \cong K_d$, увеличить разрешение за счет емкости практически невозможно.

Селективность колонок в эксклюзионной хроматографии определяется их разделительной емкостью. Если набор колонок оптимизирован по диапазону разделения, то для повышения селективности приходится увеличивать число колонок, а следовательно, и продолжительность анализа.

Таким образом, главным фактором повышения разрешающей способности является увеличение эффективности колонок и хроматографической системы в целом.

Эффективность колонок характеризуют числом теоретических тарелок N , которое определяют по пику низкомолекулярного соединения, свободно проникающего во все поры сорбента. Так, при работе с тетрагидрофураном для этой цели обычно используют толуол. Расчет числа теоретических тарелок чаще всего ведут тангенциальным методом или по ширине пика на середине высоты (см. гл. 1).

В процессе эксклюзионного разделения полимера за счет фракционирования молекул по размеру образуется зона определенной ширины. Размывание вещества в колонке и в других элементах жидкостного тракта хроматографа (внеколоночное размывание) приводит к дополнительному расширению этой зоны. Зарегистрированная хроматограмма полимера представляет собой кривую, в которой суммированы указанные эффекты. Общую дисперсию* хроматограммы можно представить выражением

$$\sigma_{\text{хр}}^2 = \sigma_{\text{фр}}^2 + \sigma_{\text{к}}^2 + \sigma_{\text{в}}^2,$$

где $\sigma_{\text{фр}}^2$ — дисперсия, обусловленная фракционированием полимера (целевой эффект); $\sigma_{\text{к}}^2$ — дисперсия, обусловленная размыванием в колонке; $\sigma_{\text{в}}^2$ — Дисперсия, обусловленная внеколоночным размыванием.

* Если форма пика соответствует гауссовой кривой, то его ширина у основания, ограниченная касательными в точках перегиба, равна 4σ , где σ — стандартное отклонение гауссовой кривой. Дисперсия σ^2 представляет собой квадрат стандартного отклонения.

Два последних фактора нежелательны, так как снижают эффективность разделения. Их сумма $\sigma_n^2 = \sigma_{\text{к}}^2 + \sigma_{\text{в}}^2$ представляет собой дисперсию приборного уширения хроматографической системы. Значение σ_n^2 можно достаточно точно вычислить по ширине пика индивидуального соединения, элюирующегося из колонки с объемом, близким к V_t .

В эксклюзионной хроматографии до недавнего времени широко использовали колонки, набитые сорбентами с размером зерна 40-100 мкм (например, колонки со стирогелями зернением 37-75 мкм). Внутриколоночное размывание в этих колонках было достаточно большим, и во многих случаях для получения корректных результатов анализа требовалось вводить поправку на приборное уширение. Современные колонки, заполненные сорбентами с размером зерна 5-10 мкм, имеют значительно более высокую эффективность (до 50000 - 60000 т.т./м), значение $\sigma_{\text{к}}^2$ у них мало, а приборное уширение в значительной степени определяется внеколоночным размыванием. Поэтому при работе с такими колонками нужно обращать особое внимание на минимизацию мертвых объемов во всех внеколоночных коммуникациях.

Удобным критерием оценки разрешающей способности хроматографической системы является отношение разделительной емкости C_2 к корню квадратному из дисперсии приборного уширения $\sqrt{\sigma_n^2}$ [42]. При $C_2 / \sqrt{\sigma_n^2} \geq 7$ молекулярно-массовые характеристики, найденные из хроматограмм без учета приборного уширения, отличаются от результатов, полученных абсолютными методами, не более чем на 5% [21, 42]. Эффективность систе-

мы, необходимую для достижения указанной точности, предложено определять по формуле:

$$\frac{\sqrt{N}}{C_1 / C_2 - \lg M} \geq 7,3$$

При этом компоненты, различающиеся по молекулярной массе на 5%, должны разделяться с коэффициентом разрешения не менее 0,09 [43].

Современные хроматографические системы, оптимизированные по селективному диапазону разделения, характеризуются эффективностью не менее 12000-15000 т.т. и значением $C_2 / \sqrt{\sigma_n^2} \geq 12-15$. Такие параметры позволяют получать надежные характеристики ММР полимеров без учета приборного уширения. При очень узком ММР ($M_w/M_n < 1,1-1,2$) поправка на приборное уширение необходима даже при использовании разделительных систем с очень высокой эффективностью. Комплекс проблем, связанных с приборным уширением и его влиянием на результаты эксклюзионно-хроматографического анализа полимеров, подробно рассмотрен в монографиях [1-3].

2.4.5.3 Калибровка хроматографической системы

Определение молекулярных характеристик по данным эксклюзионной хроматографии проводят с помощью калибровочной кривой, отражающей связь удерживаемых объемов с молекулярной массой. Существует несколько методов калибровки хроматографической системы. Наиболее надежным из них является калибровка по узкодисперсным образцам исследуемого полимера ($M_w/M_n < 1,1$). В этом случае хроматографируют ряд стандартов, перекрывающих требуемый диапазон молекулярных масс, измеряют удерживаемые объемы в максимумах пиков и строят зависимость логарифма молекулярной массы от удерживаемого объема, получая калибровочную кривую типа показанной на рис.2.16. Если по каким-либо причинам не удастся получить линейную калибровочную зависимость, то нелинейную S-образную кривую аппроксимируют полиномом (обычно достаточно полинома третьей степени). Этот метод часто используют при исследовании индивидуальных макромолекул, в частности, белков. Так, на рис.2.18 приведена Калибровочная зависимость для геля TSK3000SW, построенная по 25 белкам. Однако для многих типов синтетических полимеров такие стандарты обычно отсутствуют, а их приготовление чрезвычайно трудоемко. Наиболее доступны стандарты полистирола. Они, как правило, имеют нормальное логарифмическое ММР, для которого справедливо соотношение $M_p = \sqrt{M_w * M_n}$ (M_p — молекулярная масса, соответствующая максимуму пика полимера), и широко применяются в практике эксклюзионной хроматографии. При использовании калибровочной кривой, построенной по полистирольным стандартам, для определения молекулярных характеристик других полимеров результаты получают в относительных величинах (в так называемой «полистирольной шкале»).

Калибровку по полистирольным стандартам вследствие ее простоты и доступности можно применять в тех случаях, когда знание истинных молекулярных масс не является необходимым, в частности, при сравнении свойств различных образцов, предварительном исследовании неизвестных продуктов, отработке технологических режимов синтеза полимеров и т.д.

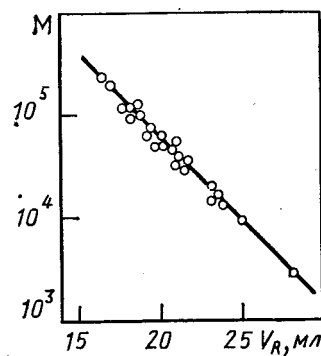


Рис. 2.18. Калибровочная кривая для TSK 3000 SW по индивидуальным белкам

Данный метод, естественно, не позволяет определить истинные значения молекулярных масс, но дает возможность проводить корректное сравнение молекулярных характеристик различных образцов исследуемого материала. Следует иметь в виду, что найденные таким образом величины молекулярных масс могут существенно (в 1,5-3 раза) отличаться от истинных значений, а ошибка в полидисперсности образцов обычно невелика.

Особенно важное значение в эксклюзионной хроматографии имеет универсальная калибровочная зависимость, предложенная Бенуа и сотр. [44]. Авторы показали, что разделение гибкоцепных полимеров совершенно различного состава и строения на стирогеле в тетрагидрофуране описывается единой калибровочной кривой в координатах $V_R - \lg([\eta]M)$, где произведение характеристической вязкости на молекулярную массу характеризует гидродинамический объем макромолекул. Было установлено, что эта зависимость справедлива также для глобулярных и жесткоцепных макромолекул. Необходимым условием применимости универсальной калибровки является полное исключение сорбционных взаимодействий полимера с матрицей сорбента. В монографии [3] сформулированы следующие ограничения применения универсальной калибровки.

1. Универсальная калибровка выполнима, если разделение проводят в термодинамически «хорошем» растворителе, который активно адсорбируется на матрице неорганического сорбента или является «хорошим» для полимерных молекул, образующих матрицу полужесткого геля.

2. Универсальная калибровка может быть справедлива для полимера в «плохом» растворителе, если последний является «хорошим» (или адсорбционно-активным) по отношению к сорбенту.

3. Универсальная калибровка невыполнима при разделении в растворителе, который не предотвращает взаимодействия макромолекул с матрицей сорбента.

На основе универсальной калибровки легко рассчитать калибровочную зависимость для любого полимера, если известны значения констант Марка—Куна—Хаувинка K и a для эталонного и исследуемого полимера в используемом растворителе при температуре разделения.

В качестве эталонного полимера обычно используют полистирол, для которого получают калибровочную зависимость в координатах $V_R - \lg M$, как описано выше. Далее по уравнению

$$\lg M_2 = [1/(1 + a_2)] \lg(K\eta_1/K\eta_2) + [(1 + a_1) / (1 + a_2)] \lg M_1,$$

где $K\eta$ и a — константы уравнения Марка—Хаувинка;

индексы 1 и 2 относятся соответственно, к полистиролу и исследуемому полимеру

рассчитывают искомую калибровочную кривую. Значения $K\eta$ и a для ряда комбинаций полимер — растворитель приведены в приложении 14.4. Эти данные взяты в основном из работ [20, 45], а для растворов в трихлорбензоле — из работы [46]. Следует иметь в

виду, что эти константы постоянны только в определенном диапазоне молекулярных масс, поэтому нередко приходится использовать несколько пар значений $K\eta$ и a . Это обстоятельство еще раз подчеркивает преимущества колонок с линейной калибровкой, так как при отсутствии значений $K\eta$ и a для какого-то диапазона молекулярных масс калибровочную зависимость можно экстраполировать в пределах ее линейности.

Достаточно часто используют методы калибровки по нескольким полидисперсным образцам полимеров, для которых известны какие-либо комбинации M_n , M_w и $[\eta]$. В связи со сложностью расчетов для их реализации необходимо использовать ЭВМ и специальные программы. Эти методы описаны в монографиях [19—21].

Современное состояние проблемы калибровки разделительных систем для эксклюзионной хроматографии детально рассмотрено в обзорах [47, 48].

В заключение необходимо еще раз подчеркнуть, что даже незначительное изменение общего объема хроматографической системы, например замена фитинга колонки, детектора, коммуникации и т.п., и условий эксперимента приводит к росту погрешностей анализа. Поэтому калибровать нужно всю систему в целом. Это особенно важно при работе на современных высокоэффективных колонках с жесткими гелями, когда на разделение полимера с широким ММР расходуется всего 5-15 мл растворителя. Калибровка и анализ образцов должны выполняться в строго одинаковых условиях, при которых отсутствует зависимость удерживаемых объемов от концентрации пробы, скорости потока и температуры. Отклонение рабочих условий анализа от условий калибровки приводит к очень большим погрешностям: так, при изменении температуры на $\pm 10^\circ\text{C}$ ошибка определения средних молекулярных масс возрастает до 10-20% [19,49], а при изменении расхода элюента на $\pm 10\%$ - до 50-170% [23, 49].

2.4.5.4. Обработка результатов

При значительном объеме анализов расчеты целесообразно проводить на мини-компьютере, непосредственно соединенном с хроматографом. Ручная обработка, описанная ниже, менее точна и занимает много времени.

Хроматограмму полимера разбивают на n равных частей ($n=15-50$) вертикальными линиями и измеряют высоты h_i между кривой и базовой линией. Соответствующие величины удерживаемого объема отсчитывают от момента ввода пробы. По калибровочной зависимости для каждого удерживаемого объема определяют соответствующие молекулярные массы M_i . Результаты сводят в таблицу и заполняют добавочные графы. После заполнения таблицы суммируют числа в столбцах 2, 5 и 6 и получают величины Σh_i , $\Sigma h_i / M_i$ и $\Sigma h_i M_i$. Из этих сумм рассчитывают средние молекулярные массы по формулам:

$$M_n = \frac{\Sigma h_i}{\Sigma h_i / M_i} ; M_w = \frac{\Sigma h_i / M_i}{\Sigma h_i}$$

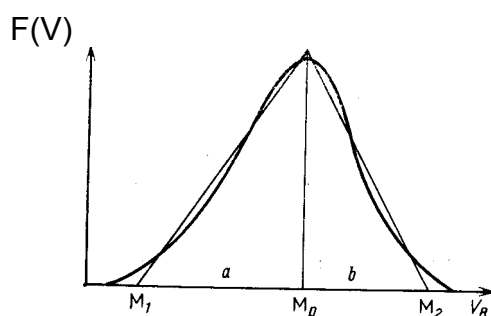


Рис. 2.19. Определение средних молекулярных масс методом «треугольника»

Отношения $h_i/\Sigma h_i$, приведенные в столбце 4, представляют собой массовые доли каждой фракции полимера, заключенной между вертикальными линиями в точках i и $j=i+1$; в столбце 7 даны значения кумулятивной массовой доли (начиная от минимальных масс), которая для i -й фракции определяется суммой массовых долей всех предшествующих фракций и половины массовой доли этой фракции $f_i/2$. Откладывая на оси абсцисс средние молекулярные массы фракций, начиная с меньшей, а на оси ординат — соответствующие значения массовой или кумулятивной массовой доли, получают дифференциальную и интегральную кривые ММР полимера.

Достоинством данного метода является его применимость для обработки хроматограмм любой формы. Для унимодальных хроматограмм предложены более быстрые графические методы определения средних молекулярных масс [21].

Асимметричные хроматограммы аппроксимируют треугольником, как показано на рис. 2.19. По калибровочной зависимости находят значения молекулярных масс, соответствующие точкам M_1 , M_2 и M_p . Определяют $a=M_1/M_2$ и $b=M_1/M_p$ и рассчитывают M_n и M_w по формулам

$$M_n = M_p \frac{\ln a + \ln b}{[(2a-2)/\ln a] - [(2b-2)/b \ln b]};$$

$$M_w = M_p \frac{[(2b-2)/\ln b] - [(2a-2)/a \ln a]}{\ln a + \ln b}.$$

Форма таблицы для расчета молекулярных характеристик

Удерживаемый объем, V_i	Высота отрезка, h_i	Молекулярная масса, M_i	Массовая доля фракции, $F_i = h_i/\Sigma h_i$	h_i/M_i	H_i/M_h	Кумулятивная доля фракции, $i=1$ $W' = \Sigma F_i + (f_i/2)$ $j=1$
1	2	3	4	5	6	7

Симметричные хроматограммы гауссовой формы характерны для полимеров, ММР которых близко к логарифмически нормальному.

В этом случае для расчета используют формулы

$$\ln M_n = \ln M_p - (1/2) \sigma_{xp}^2 D_2^2; \quad \ln M_w = \ln M_p + (1/2) \sigma_{xp}^2 D_2^2;$$

$$\ln M_w/M_n = \sigma_{xp}^2 D_2^2,$$

где $D_2 = 2,303 / C_2$.

Приближенное определение полидисперсности по симметричным хроматограммам можно провести без калибровки, если имеется подходящий полимер с логарифмически нормальным ММР и известной полидисперсностью [19, 50].

Определив дисперсию хроматограмм вышеупомянутого и реализуемого полимеров, рассчитывают искомую величину из пропорции:

$$(M_w/M_n)_1 : (M_w/M_n)_2 = \sigma^2 x_{p1} : \sigma^2 x_{p2}.$$

Различия в значениях средних молекулярных характеристик, рассчитанных для симметричных хроматограмм тремя методами, находятся в пределах 3-10% [21].

2.4.6. Другие области применения

Основной областью применения эксклюзионной хроматографии, безусловно, является исследование полимеров. Однако уникальные особенности этого метода, отличающие его от всех остальных вариантов ВЭЖХ (разделение молекул по размеру и полное элюирование всех компонентов из колонки за короткое время), обуславливают его преимущественное использование и для решения других задач. К ним, в первую очередь, относится разделение молекул, заметно различающихся по размерам.

Большинство современных полимерных материалов содержит различные низкомолекулярные добавки: пластификаторы, антиоксиданты, смягчители, отдушки и др. Часто встречается и обратная ситуация: высокомолекулярные вещества вводят в относительно низкомолекулярные продукты с целью получения композиций, обладающих необходимыми свойствами. Примером могут служить различные загустители, которые широко используют в косметических и медицинских препаратах и смазочных материалах, добавки для повышения температуры плавления (полиэтилен в восках) или снижения температуры застывания (депрессорные присадки к нефтепродуктам) и др. Количественное определение таких добавок наиболее просто и надежно осуществляется методом эксклюзионной хроматографии.

Этот метод также весьма удобен для сравнения различных природных и искусственных веществ, представляющих собой смеси очень сложного состава (нефтепродукты, липиды, каменноугольные и природные смолы), а также для оценки изменений, которые происходят при старении, окислении, переработке и деструкции подобных веществ. Получаемые хроматограммы наглядно иллюстрируют различия между сравниваемыми образцами даже без какой-либо предварительной информации о их составе. В ряде случаев особенно ценные сравнительные результаты получают при комбинации универсального и селективного детекторов.

В последние годы в связи с разработкой сорбентов особо высокой эффективности эксклюзионную хроматографию все чаще используют для разделения низкомолекулярных соединений. На рис. 2.20 показана хроматограмма образца полиэтиленгликоля ($M \approx 200$), а на рис. 2.21 — хроматограмма смеси фталатов и алкилбензолов (см. также рис. 5.9). Исключительно высокая инертность поверхности полужестких гелей позволяет разделять на них высоколабильные вещества, которые не удается анализировать на других сорбентах.

При анализе полярных веществ необходимо учитывать возможность их ассоциации или сольватации растворителем.

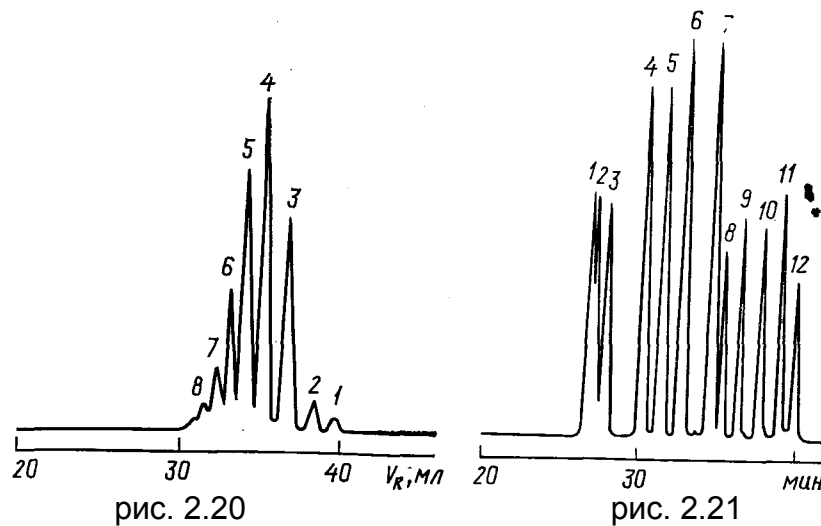


Рис. 2.20. Хроматограмма олигомеров полиэтиленгликоля 200, полученная на составной колонке 2(600X7,5) мм с TSK-гелем G2000PW, подвижная фаза 0,05 М раствор NaCl, расход 1 мл/мин, давление 2 МПа, температура 40 °С детектор—рефрактометр

Рис. 2.21. Хроматограмма фталатов и алкилбензолов, полученная на 4 колонках шодекс KF-801 размером 300x8 мм, растворитель тетрагидрофуран, расход 1 мл/мин, давление 7 Мпа, детектор – МФ (254 нм), проба 20 мкл, концентрация фталатов по 0,05%, алкибензолов – по 0,1%:

1 – динонилфталат; 2 – диоктилфталат; 3 – дигексилфталат; 4 – дибутилфталат; 5 – дипропилфталат; 6 – диэтилфталат; 7 – диметилфталат; 8 – η-бутилбензол; 9 – η-пропилбензол; 10 – этилбензол; 11 – толуол; 12 - бензол

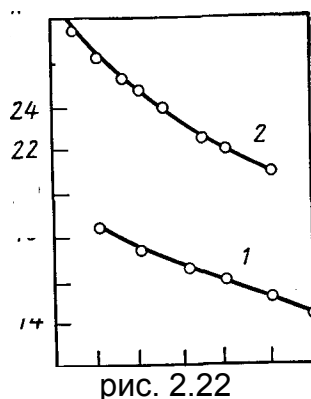


рис. 2.22. Зависимость удерживаемого объема жирных кислот и углеводов на μ-стирогеле от числа атомов углерода в молекуле:

1—жирные кислоты; 2 — углеводороды

На рис. 2.22 приведен график зависимости удерживаемого объема нормальных жирных кислот и парафиновых углеводородов от числа атомов углерода в молекуле при использовании тетрагидрофурана в качестве подвижной фазы. Значительная разница в удерживаемых объемах углеводородов и кислот вызвана тем, что последние образуют водородные связи с тетрагидрофураном и элюируются из колонки в виде более крупных по размеру сольватных комплексов.

В растворителях, не способных к образованию водородной связи (например, бензол, CCl₄), карбоновые кислоты также имеют меньший удерживаемый объем, чем углеводороды, но за счет ассоциации с образованием димерных молекул.

В связи с исключительным многообразием структур химических соединений и невозможностью предварительного определения размера их молекул в растворе при эксклюзионном разделении малых молекул нельзя построить какую-либо общую

калибровочную зависимость. Для построения таких зависимостей в качестве калибровочных параметров чаще всего используют длину молекул, мольный объем или молекулярную массу [51—53]. При исследовании веществ с примерно одинаковой конфигурацией молекул по полученным калибровочным кривым можно с достаточной надежностью определять соответствующие параметры неизвестных соединений.

И наконец, эксклюзионная хроматография представляет собой наилучший метод для предварительного исследования образцов неизвестного состава. За короткое время, практически не опасаясь каких-либо нежелательных превращений вещества в колонке, можно получить ценную информацию о степени сложности анализируемой смеси и (ориентировочно) о молекулярной массе ее компонентов. Все остальные разновидности ВЭЖХ требуют достаточно больших затрат времени при выборе условий разделения. Результаты предварительного разделения часто облегчают выбор варианта ВЭЖХ, который целесообразно использовать для детального изучения состава образца. Кроме того, эксклюзионная хроматография обычно является первым этапом при исследовании сложных смесей путем сочетания различных вариантов ВЭЖХ, так как позволяет легко выделить из смеси нужную группу веществ.

ГЛАВА 3

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ВАРИАНТЫ ВЭЖХ

3.1. ПРЕПАРАТИВНАЯ ВЭЖХ

К настоящему времени не создан единый вариант метода препаративной ВЭЖХ, который обладал бы как большой скоростью и эффективностью разделения, так и высокой производительностью и экономичностью. Поэтому предложены варианты метода, значительно различающиеся по размерам и эффективности колонок, по производительности работы, требованиям к оборудованию и затратам на оборудование, сорбенты и растворители [54—56]. При выборе оптимального варианта препаративной ВЭЖХ для каждой конкретной задачи исследователю приходится сталкиваться с рядом трудностей и проблем.

Первой и основной трудностью является высокая стоимость узко сепаративных сорбентов, особенно привитых, с размером частиц от 5 до 20 мкм. Если с этим можно мириться для аналитических колонок диаметром 2—5 мм, то стоимость резко растет при использовании колонок диаметром 10, 20 или 40 мм и может составить соответственно 200, 800 и 3200 рублей (без учета стоимости металлических колонок и работы по их заполнению). Кроме того, такие колонки достаточно непросто заполнять суспензионным способом.

Вторая трудность—создание хроматографов, насосы которых могли бы подавать растворитель при давлениях 5—20 МПа при расходе 5—100 мл/мин, а инжекторы позволяли бы водить без размывания пробы объемом 0,5—10 мл. Для таких насосов необходимы довольно мощные, дорогостоящие и тяжелые электродвигатели, сложные и дорогие уплотнения, клапаны и т.д.

Третья трудность—необходимость расходования больших объемов растворителей высокой чистоты, что приводит к большим затратам труда и времени на их регенерацию и очистку или к большим тратам на их приобретение. Расход растворителя достигает 10 л и более на 1 г препаративно выделенного очищенного продукта.

Наконец, существуют проблемы, связанные с ограниченной растворимостью образца в растворителе, повышенной вязкостью концентрированных растворов, взрыво- и пожароопасностью работы, необходимостью удаления больших объемов растворителей под вакуумом и т.д.

Конечно, все эти трудности возрастают по мере роста масштаба работы и количества вещества, которое нужно препаративно выделить или очистить. Отсюда

первое правило: масштаб препаративного разделения должен быть мал настолько, насколько позволяют поставленные задачи.

Многие проблемы, связанные с выделением 1—10 мг чистых веществ для их идентификации современными высокочувствительными физико-химическими методами легко разрешаются на обычных аналитических колонках диаметром 4—5 мм путем многократного ввода проб и сбора фракций. Как правило, для таких работ не требуется никакого специального оборудования, кроме обычного аналитического хроматографа, а сбор фракций осуществляется вручную. Производительность работы можно увеличить без существенного изменения аппаратуры, заменив аналитическую колонку на препаративную диаметром 10—14 мм: как правило, насосы способны подавать до 5—10 мл/мин растворителя, а инжекторы—вводить 0,1—1 мл пробы. Правда, стоимость оборудования увеличивается на стоимость такой колонки, однако и производительность работы возрастет в 4—10 раз. Дальнейшего увеличения количества выделяемого вещества можно добиться уже только при значительном усложнении и удорожании оборудования.

Так, разделить большие количества на аналитическом хроматографе с колонкой диаметром 10—14 мм можно при увеличении продолжительности его работы, чего можно достигнуть путем автоматизации процесса ввода и сбора образца. Для этого хроматограф должен быть оснащен коллектором фракций, автоматическим устройством ввода пробы и компьютером, управляющим их работой. Для некоторых жидкостных насосов предусмотрена возможность установки специальных препаративных головок, иногда с рециклом разделенных фракций, позволяющих использовать эти насосы с колонками диаметром 20—25 мм (при производительности до 20—30 мл/мин) или 35—50 мм (до 100 мл/мин). Соответственно петлевой инжектор должен иметь достаточно широкие внутренние каналы и возможность установки петли размером до 10 мл. Конструкция и геометрия петли должны быть такими, чтобы обеспечивалось минимальное размывание образца при вводе пробы: длинные петли малого диаметра без резких изменений геометрии потока предпочтительней коротких и большого диаметра. Нередко удается заметно улучшить разделение, одновременно уменьшив размывание образца при вводе пробы путем ввода пробы без инжектора, установив вместо него тройник малого Ир объема и вводя пробу вспомогательным насосом высокого ржавления, работающим короткий отрезок времени. Менее удобным способом, дающим сходный результат, является ввод больших проб на колонку шприцем с использованием инжектора с прокалываемой резиновой мембраной, или краном малого объема, однако при этом ввод пробы (из-за ограниченного давления, которое можно создать шприцем даже хорошего качества: около 5 МПа для шприца емкостью 1 мл и около 1 МПа—для шприца емкостью 10 мл) осуществляют при остановке потока (выключении основного насоса).

При использовании колонок большого диаметра (10 мм и более) особое внимание должно быть уделено выбору сорбента. Как правило, дорогие узкодисперсные сорбенты с размером частиц 5 или 10 мкм для широких колонок использовать нецелесообразно из-за высокой стоимости и трудности суспензионной упаковки. Поэтому часто идут на компромиссное решение и используют препаративную фракцию того же сорбента с размером частиц 25—40 мкм или 40—70 мкм, которая выпускается рядом фирм специально для этих целей. Преимуществом такого сорбента является возможность упаковки сухим способом в колонки большого диаметра, более низкая стоимость (в 3—6 раз дешевле) при полном сохранении химической природы поверхности и пористости сорбента, используемого в аналитическом варианте. Кроме того, при работе с более крупным сорбентом требуется значительно меньшее давление, что упрощает работу и позволяет использовать более дешевое оборудование.

Выпускают также сорбенты для препаративной работы с размером частиц 15—25 мкм. Колонки, заполненные такими сорбентами суспензионным методом, имеют высокую эффективность. При использовании непривитого силикагеля, колонок очень большого диаметра (более 20 мм) и при необходимости очистки или выделения очень больших

количеств вещества нередко практикуется применение дешевого и доступного сорбента. Часто используют силикагель для ТСХ (фракция 5—40 мкм), который нередко фракционируют седиментацией для сужения фракционного состава (отделяют пылевидные частицы, заметно повышающие гидравлическое сопротивление колонки, и наиболее крупные). Нередко применяют наиболее мелкую фракцию (40—70 мкм), имеющуюся в продаже для колоночной хроматографии. Однако переход на сорбент с другим размером и распределением пор и с несколько другими химическими свойствами поверхности может привести к заметному изменению разделения, удерживания, а иногда даже и порядка выхода разделяемых компонентов. Такие же изменения наблюдаются и при переходе от привитого сорбента одной фирмы к препаративному сорбенту другой фирмы.

Количество образца, которое можно ввести на колонку для препаративного разделения, зависит от многих факторов, и для каждого случая должно определяться экспериментально, предпочтительно с использованием аналитической колонки и растворов образца разной концентрации. В самом общем виде можно сказать, что масса образца, которую можно ввести, составляет от 0,1 до 1 мг на 1 г сорбента при отсутствии заметной перегрузки колонки пробой (снижение эффективности колонки менее чем в 2 раза). Как правило, препаративные разделения проводят при максимально возможной перегрузке колонки пробой, поэтому чем больше α для разделяемых компонентов, тем больше можно перегрузить колонку пробой и тем соответственно больше получить разделенного вещества за препаративный цикл. При разделении простых смесей, когда работают с большой перегрузкой, эффективность препаративных колонок с мелкими узкодисперсными сорбентами по основным пикам быстро падает, но по пикам примесей остается высокой, что позволяет отделять их более четко. При работе с большой перегрузкой эффективность по основным пикам для малоэффективных колонок и колонок средней и высокой эффективности близка. Однако по мере усложнения задачи (более сложные смеси, меньше α) допустимая перегрузка уменьшается и малоэффективные колонки становятся непригодными, они перестают обеспечивать разделение и получение чистых компонентов даже при отсутствии перегрузки.

Растворители, используемые для препаративной работы, должны быть, как правило, перегнанными, профильтрованными и не содержать примесей, так как в процессе выделения образца из фракции упариванием его концентрация (и концентрация примесей, остающихся в нем от недостаточно чистого растворителя) увеличивается в 200—1000 раз. Смена растворителя в препаративной ВЭЖХ с колонками большого диаметра и уравнивание колонки с новым растворителем обычно достаточно длительны, сопровождаются большим расходом растворителей, поэтому работу надо планировать так, чтобы делать это по возможности редко. Раствор образца определенной концентрации должен быть приготовлен на основании экспериментов, выполненных на колонке с таким же сорбентом, но меньшего размера: вводят пробы растворов разной концентрации и объема и выбирают соотношение, позволяющее нагрузить колонку наибольшим количеством образца при достаточном для сбора препаративных фракций в чистом виде разделении. Раствор образца должен быть тщательно профильтрован и не содержать взвесей твердых частиц, в том числе и выпадающих в процессе его хранения до конца препаративной работы. Целесообразно для предохранения колонки от возможного загрязнения такими частицами ввести в систему фильтр малого объема между инжектором и препаративной колонкой. Нужно стараться проводить всю препаративную работу в максимально сжатые сроки, предохраняя раствор образца и собранные фракции от длительного контакта с воздухом, светом и повышенной температурой. Чем ниже температура и меньше срок хранения раствора, чем быстрее отгоняется растворитель от собранных фракций, тем чище получаются собранные вещества и легче вся дальнейшая работа с ними.

Особое место в препаративной ВЭЖХ занимает эксклюзионная хроматография макромолекул. Этот метод используют в предварительном варианте для выделения целевых веществ или их групп из смесей, содержащих компоненты с заметно

различающейся молекулярной массой. Исключительную важность этот метод имеет для очистки лабильных биополимеров. Так, на препаративных колонках с TSK-гелями SWG за один ввод можно очистить 100—200 мг ферментов. Разработана технология приготовления высокоэффективных препаративных колонок для эксклюзионной хроматографии синтетических полимеров. Это позволило решить одну из наиболее трудных проблем исследования полимеров — быстрое получение узких фракций, необходимых для исследовательских целей и для калибровки аналитических систем. Особенно важным является то обстоятельство, что этим методом можно фракционировать практически любые полимеры, в то время как классические методы фракционирования не только несоизмеримо более трудоемки, но и малопригодны для разделения многих объектов, в частности, образцов с молекулярной массой до 10 000—30000.

Следует отметить, что при разделении синтетических полимеров нельзя сильно перегружать колонку. За счет вязкостного эффекта наблюдается сильное смещение удерживаемых объемов, что резко ухудшает качество получаемых фракций. Тем не менее производительность процесса достаточно высока. Так, при препаративном разделении на колонке размером 250x21,5 мм с зорбаксом-сил эффективностью около 10000 т.т. при единовременном вводе 200 мг образца сополимера этилена с винилацетатом (объем дозы 8 мл, концентрация 2,5%) разделение заканчивалось за 5 мин при скорости подвижной фазы (тетрагидрофуран) 16 мл/мин. Такая скорость разделения позволила за рабочий день фракционировать 8 г сополимера даже без применения автоматического дозатора с ручным отбором фракций каждые 20 с. Характеристики полученных фракций представлены в табл. 3.1.

Эти результаты показывают, что в выбранных условиях удалось получить весьма узкие фракции сополимера с молекулярной массой более 3000. Две последние фракции асимметричны и имеют заметно большую полидисперсность за счет присутствия продуктов с более высокой молекулярной массой, сильнее адсорбирующихся на силикагеле.

Чтобы полностью избежать проявления адсорбционных эффектов, разделение нужно проводить на колонках с полужесткими гелями.

Таблица 3.1. Характеристики узких фракций сополимера этилена с винилацетатом

№ фракции	M_w	M_n	M_w/M_n
Исходный образец	6300	2700	2,33
2	10700	9300	1,15
3	6600	5600	1,18
4	3600	2950	1,22
5	2000	1450	1,38
6	1650	800	2,06

3.2. МИКРОКОЛОНОЧНАЯ ВЭЖХ

Среди специалистов до настоящего времени идут споры о том, какую хроматографию следует считать микроколоночной, какую обычной аналитической, но в меньшем масштабе [57, 58]. Если жидкостная хроматография с использованием поверхностно-пористых (пелликулярных) сорбентов осуществляется на колонках

диаметром около 2 мм и даже 1 мм и длиной до нескольких метров, можно ли считать ее микроколоночной ВЭЖХ или нет? Можно ли отнести к области современной микроколоночной хроматографией ранние работы с использованием заполненных микрочастицами размером 5 и 10 мкм тефлоновых колонок, эффективность которых 500—1500 т.т.?

Представляется целесообразным считать, что современная микроколоночная ВЭЖХ возникла около 8 лет назад и признаками ее появления в окончательно сформированном виде следует считать, во-первых, разработку технологии заполнения высокоэффективных колонок диаметром 2 и 1 мм, объемом от 50 до 800 мкл и имеющих приведенную ВЭТТ от 2 до 5, т. е. такую же, как у современных аналитических колонок, с микрочастицами размером 3, 5, 7 и 10 мкм (до 20 мкм), во-вторых, создание, разработку и серийный выпуск как специально разработанных узлов, так и хроматографов для микроколоночной ВЭЖХ. Достигнутая степень миниатюризации ВЭЖХ с колонками диаметром 1 мм уже позволила широко ввести этот метод в практику и оценить получаемые преимущества резкое снижение расхода растворителя и сорбента (в 15—25 раз), повышение чувствительности метода и снижение определяемого минимума вещества в пробе (в 15—25 раз). Это существенно ускорило внедрение жидкостной хроматографии в биологию, биотехнологию, медицину.

Проводимые работы по развитию микроколоночной ВЭЖХ, направленные на дальнейшую миниатюризацию колонок, очевидно, являются перспективными и нужными, однако их освоение и внедрение в практику в большой мере сдерживается техническими трудностями. Описаны капиллярные колонки для ВЭЖХ с внутренним диаметром около 5 и 10 мкм, в том числе и с привитыми фазами, позволившие получить эффективность до нескольких миллионов т.т.; описаны колонки с привитыми сорбентами, имеющие внутренний диаметр около 30—50 мкм, также позволившие получить эффективность около миллиона т.т. Однако ввод проб в такие колонки, особенно количественный, стабильная подача растворителей с расходом 0,01—1 мкл/мин при давлениях 10—40 МПа, наконец, создание детекторов с объемом кюветы в 1—20 нл, дающих высокую чувствительность,— все это только часть серьезных проблем, решить которые предстоит в дальнейшем. Сейчас можно предсказать, что в ближайшие 5—10 лет микроколоночные хроматографы с колонками диаметром 0,2—2 мм найдут самое широкое применение в аналитической практике, хотя и не станут наиболее массовыми.

Каковы же основные отличия аппаратуры для микроколоночной ВЭЖХ от обычной? Насос должен стабильно подавать растворитель при высоких давлениях (5—40 МПа) и небольших расходах (0,1—100 мкл/мин). Как правило, обычные насосы для ВЭЖХ либо не работают при таких параметрах, либо не обеспечивают стабильной подачи. Инжектор должен обеспечивать воспроизводимый ввод проб размером 0,1—1 мкл при высоких давлениях (до 40 МПа), что также не удастся осуществить, используя старые петлевые инжекторы с петлями 10 мкл и более. Для соединения колонки с инжектором и детектором приходится идти либо на прямое соединение без использования капилляров, либо использовать капилляры с внутренним диаметром 50—150 мкм очень небольшой длины (2—5 см). Наконец, детектор должен иметь кювету очень малого объема (0,03—1 мкл), но обеспечивающую высокую чувствительность детектирования (для УФ детекторов длина оптического пути должна быть от 1 до 10 мм). Для градиентной микроколоночной ВЭЖХ дополнительно возникают трудности, связанные с микроподачей элюента в начале и конце градиента (от 1% обычного расхода для микроколонки) и созданием эффективного микросмесителя вместимостью от 1 до 20 мкл. Весьма проблематичным становится формирование градиента одним насосом и системой клапанов на стороне низкого давления, так как устройство такого типа с вместимостью 10—40 мкл (включая объемы клапанной системы, подводящих капилляров и поршневой камеры или камер насоса) очень трудно представить.

Какие основные проблемы в настоящее время существуют в микроколоночной хроматографии? Во-первых, это трудность приготовления высокоэффективных колонок с внутренним диаметром 0,5—2 мм с широким диапазоном сорбентов всех типов. Во-

вторых, существует ограниченный круг детекторов с микрокюветами вместимостью 0,03—2 мкл, пригодных для работы с микроколонками, которые серийно производят в достаточно широком масштабе и по доступным ценам. Такими детекторами являются некоторые УФ-фотометры, спектрофотометры, флуоресцентные детекторы, электрохимические детекторы. Очень интересным и информативным является сочетание микроколоночной ВЭЖХ с хроматомасс-спектрометром, позволяющее существенно упростить проблему интерфейса для ряда применений, однако высокая стоимость такого детектора ограничивает его широкое применение. Разработка детекторов с лазерными источниками позволяет создать микрокюветы для рефрактометров и Других детекторов, однако стоимость таких детекторов достаточно высока. В-третьих, существуют психологические трудности и инерция производства, поддерживающие развитие традиционной ВЭЖХ и сдерживающие развитие микроколоночной.

Отечественный серийный микроколоночный хроматограф «Милихром» нашел широкое применение как в исследовательской работе, так и для контроля на производстве. Он имеет шприцевой насос вместимостью 2500 мкл, выполненный из упрочненного стекла, жидкость контактирует только с высокоинертными материалами: фторопластом, стеклом и танталом, что позволяет использовать высокоагрессивные растворители с и добавки. Насос рассчитан на давление 10 Мпа (До 1987г. – 5 Мпа.) и диапазон подачи растворителя от 1 до 600 мкл/мин. Детектором служит сканирующий спектрофотометр с диапазоном длин волн 190— 360 нм и временем сканирования от 0,15 с, что позволяет осуществлять сканирование в выбранном диапазоне длин волн без остановки потока. Диапазон оптических плотностей детектора от 12,8 до 0,05 единиц адсорбции на всю шкалу в пересчете на длину оптического пути 10 мм. Микрокювета детектора имеет вместимость 1,5 мкл при длине оптического пути 1,5 мм. Оригинально выполнен узел ввода пробы: набор пробы от 0,1 мкл и более осуществляется засасыванием пробы в иглу путем регулируемого хода шагового двигателя, управляющего насосом. Игла с пробой далее уплотняется путем обжимания фторопластового конуса вплотную к верхнему фильтру колонки, и при пуске насоса проба без размывания подается через иглу в колонку; тем же путем подается растворитель, промывающий иглу и элюирующий пробу. Таким образом, ввод пробы осуществляется без использования микрошприца, при этом удается исключить ошибки, связанные с плохой промывкой шприца от предыдущей пробы и характерные для начинающего и малоопытного оператора.

В хроматографе предусмотрено использование колонок двух типов: стеклянных с внутренним диаметром 1—1,5 мм, рассчитанных на работу при давлении до 1,5 МПа и создание полностью инертной хроматографической системы, и из нержавеющей стали длиной 60 и 120 мм с внутренним диаметром 2 мм. Все соединительные линии в хроматографе выполнены из толстостенных фторопластовых капилляров, на конце имеющих развальцовку, по которой и производится уплотнение; при низком давлении используются капилляры из полиэтилена. Шприцевой насос «Милихром» имеет привод от шагового двигателя, что позволяет не только обеспечить высокую воспроизводимость времени удерживания и количества вводимой пробы, но и формировать при необходимости в камере насоса градиент растворителя заданной формы и осуществлять градиентное элюирование сложных по составу смесей веществ. Предусмотрена также работа «Милихрома» с микроколлектором фракций, обеспечивающим сбор микрофракций для последующей идентификации другими физико-химическими методами.

Серийно выпускают хроматографы, предназначенные для микроколоночной ВЭЖХ, различные зарубежные фирмы. Следует отметить микроколоночный хроматограф «Фэмилик 300 С» фирмы «Джаско», имеющий трехплунжерный насос, микроинжектор вместимостью 1 и 3 мкл, спектрофотометр «Увидек 100 V» с кюветой вместимостью 1 мкл при 5 мм длины оптического пути и флуориметрический детектор с кюветой вместимостью 2 мкл. Эта фирма имеет большой опыт в производстве микроколоночных хроматографов, так как она выпустила в продажу первый микроколоночный хроматограф «Фэмилик 100» в 1976 г. Интересен микроколоночный хроматограф фирмы «Иско»,

имеющий шприцевой насос вместимостью 50 мл и давлением 70 МПа с подачей растворителя от 0,02 до 600 мкл/мин, микроинжектор вместимостью 0,1 мкл и спектрофотометрический детектор с кюветами разной вместимости и длины оптического пути от 0,5 мкл и 10 мм до 0,03 мкл и 1 мм. Градиентную микроколоночную систему с двумя шприцевыми насосами выпустила фирма «Броунли Лабс»; систему с двумя и тремя растворителями предлагает фирма «Хьюлетт-Пакард». Набор гибких микроколоночных хроматографов разработан фирмой «Жилсон» — от простейшего изократического с подачей растворителя от 0,5 мкл/мин при 42 МПа, с микроинжектором на 1 мкл и УФ-детектором на 254 и 280 нм с микрокюветой 1,3 мкл при 5 мм до градиентного хроматографа, имеющего в качестве детектора спектрофотометр с такой же микрокюветой или флюориметрический детектор с микрокюветой. Широкий набор спектрофотометров с микрокюветами вместимостью 0,5 мкл при 1 мм длины оптического пути выпускает фирма «Кратос»; она же выпускает флюориметрические детекторы с микрокюветами. Изократические хроматографы для микроколоночной ВЭЖХ выпускают фирмы «Шимадзу», «Кнауэр», «ЛК.Б», «Байо-Рэд», «Вариан», «Лаборатори Дэйта Контрол» и др.

Большой интерес представляет сочетание микроколоночной ВЭЖХ с масс-спектрометрией. Известно, что присутствие больших количеств растворителя в элюенте, выходящем из хроматографической колонки обычного размера (4,6 мм X 250 мм), обуславливает создание достаточно сложного и дорогого интерфейса. Этот интерфейс предназначен для удаления растворителя и транспортировки проб в ионизационную камеру масс-спектрометра. Если сечение хроматографической колонки уменьшается, как в микроколоночной ВЭЖХ, в 25—100 раз, т. е. если используют колонки диаметром от 0,5 до 1 мм, мощности насосов масс-спектрометра хватает для удаления растворителя и поддержания высокого вакуума в ионизационной камере, и необходимость в интерфейсе отпадает. Следует отметить, однако, что еще не решен ряд проблем при прямой стыковке микроколоноки и масс-спектрометра, таких, как удаление солей из элюента при использовании буферных систем растворителей, резкое снижение температуры на конце микроколоноки из-за интенсивного съема тепла при испарении растворителя и др.

Большой интерес представляют и другие сочетания микроколоночной ВЭЖХ с физико-химическими методами анализа. Например, показано, что с использованием дисков из бромида калия можно записать и запомнить хроматографическую информацию, поступающую с микроколоноки, и при необходимости получить ИК-спектр и другую информацию об интересующем пике или участке хроматограммы.

3.3 ВЭЖХ С ГРАДИЕНТОМ СОСТАВА РАСТВОРИТЕЛЯ

При разработке метода разделения сложных смесей веществ, особенно биологического и природного происхождения, Исследователю часто приходится сталкиваться с тем, что в их состав не только входит большое количество соединений, но и сильно различаются их свойства. Подобрать в этом случае сорбент и растворитель, которые обеспечивали бы разделение всех или большинства интересующих исследователя компонентов, обычно не удается. Однако еще тогда, когда колонки в хроматографии были малоэффективными, было найдено и средство для решения таких задач — использование растворителя, элюирующая сила которого постепенно увеличивалась. Это приводило к тому, что как слабо, так и сильно удерживаемые вещества выходили из колонки за приемлемо короткое время, при этом зоны сильно удерживаемых соединений сужались и давали более узкие и симметричные пики. Когда эффективность колонок была повышена, популярность градиентного элюирования несколько уменьшилась, однако для многих объектов до настоящего времени это единственно приемлемый вариант — ВЭЖХ с градиентом растворителя, или градиентная ВЭЖХ (ГВЭЖХ).

С какими же проблемами сталкивается исследователь, переходя от изократической ВЭЖХ к градиентной? Проблем здесь несколько, и рассмотрение их целесообразно разделить на связанные с конструкцией прибора, с выбором колонки и с выбором растворителя для ГВЭЖХ.

Прибор для градиентной ВЭЖХ, как видно из самого определения, должен иметь устройство для изменения состава растворителя по заданной исследователем программе. Возможны два варианта такого устройства: создание градиента при низком давлении растворителей с подачей смеси в насос и создание градиента при высоком давлении, когда каждый из растворителей (сильный и слабый) подается своим насосом с переменной скоростью, так чтобы элюирующая сила смеси увеличивалась. Оба варианта подробно рассмотрены в гл. 8.

В приборе для ГВЭЖХ, помимо обычных узлов, появляются дополнительно программатор (устройство формирования градиента), управляемые им система клапанов или второй насос (для градиента низкого и высокого давления соответственно), смеситель. Этим обусловлен первый недостаток ГВЭЖХ — приборы для нее примерно вдвое дороже, чем для изократической ВЭЖХ.

Нередко в состав системы для ГВЭЖХ приходится добавлять дорогое устройство для эффективной дегазации растворителей продуванием гелия, действием вакуума на растворитель, подаваемый через специальные полупроницаемые трубки и т.д. Это связано с тем, что при смешении плохо дегазированных растворителей всегда выделяются пузырьки, так как растворимость газа в смеси растворителей обычно отличается от суммы растворимостей в чистых растворителях. Это особенно опасно при градиенте низкого давления, так как пузырек газа, попавший в клапанную систему и в насос, полностью нарушает их работу. Наконец, в градиентной системе существует довольно заметный объем от места формирования градиента растворителя до места его поступления в колонку: обычно этот объем составляет от 1 до 3 мл или больше, поэтому состав растворителя, поступающего в колонку, отличается от того, который формируется в это же время. При работе на колонках малого диаметра (1—2 мм) и при небольших расходах растворителя (10—200 мкл/мин) это приводит к еще большим отличиям. Затруднительно гомогенное смешение сильного и слабого растворителей, поступающих в смеситель: недостаточно эффективное смешение и неоднородность потока вызывают заметное увеличение шумов, что мешает использовать чувствительные шкалы детектора. Наконец, при градиентном элюировании практически исключается использование рефрактометрического детектора, так как изменение показателя преломления при изменении состава растворителя приводит к нарушению его работы.

Выбор сорбента и колонки для ГВЭЖХ также имеет свои особенности. Прежде всего, колонка должна быстро приходить в равновесие с растворителем постоянно изменяющегося состава как в процессе градиентного элюирования, так и при возвращении к исходному составу растворителя при подготовке колонки к новому анализу. Если для старых колонок в жидкостной хроматографии, работавших однократно, градиент формировался и использовался один раз, после чего сорбент в колонке заменялся свежим, и это позволяло применять силикагель и оксид алюминия, то для ГВЭЖХ эти сорбенты не подходят, так как уравнивание их со слабым растворителем после градиента слишком длительно. Однако современные обращенно-фазные и другие привитые сорбенты достаточно быстро приходят в равновесие с исходным растворителем после окончания градиентного элюирования, что позволяет успешно использовать их для этих целей. Время, необходимое для уравнивания колонки, для каждого сорбента устанавливается экспериментально по достижению постоянства времени удерживания веществ, входящих в анализируемую смесь. Это время различно как для разных сорбентов, так и для разных по составу растворителей, и может колебаться от десятков до нескольких сотен минут.

Наконец, очень важно правильно выбрать растворитель и добавки для него при ГВЭЖХ. Если при изократической ВЭЖХ небольшие примеси, присутствующие в растворителе, приходят в равновесие с сорбентом и обычно не дают ложных пиков или

увеличения шумов, то в ГВЭЖХ требования к чистоте растворителей значительно более жесткие. Например, в случае обращенно-фазной ГВЭЖХ использование воды, недостаточно очищенной от органических загрязнителей, присутствующих в природной воде или привнесенных в процессе ионообменной очистки или перегонки, приводит к появлению набора интенсивных пиков, элюируемых из колонки метанольно-водным или ацетонитрильно-водным градиентом. Перегонка воды часто приводит (если аппаратура выбрана неудачно) не к уменьшению, а к увеличению количества и содержания органических загрязнителей, добавляющихся при контакте воды с недостаточно чистой аппаратурой, полимерными пробками и шлангами, смазками на органической основе и т.д. Кроме того, многие органические вещества, малолетучие сами по себе, способны легко перегоняться с водяным паром и, следовательно, загрязнять конденсат. Наиболее надежным методом очистки воды для ГВЭЖХ следует признать двукратную дистилляцию в стеклянной или кварцевой аппаратуре на шлифах, при этом на первой стадии проводится окисление примесей перманганатом калия, а на второй — обработка щелочью для удаления кислых веществ. Если после этого необходима дополнительная очистка, ее проводят пропусканием воды через колонку большого диаметра с крупным (30—100 мкм) обращенно-фазным сорбентом, используемым для препаративной работы и относительно дешевым. Хранить такую высокочистую воду желательно в темном месте в бутылки, тщательно закрытой пробкой. Вода не должна контактировать с полимерами, выделяющими в нее продукты деструкции, стабилизаторы, пластификаторы и другие загрязнители. Желательно не хранить высокочистую воду длительный срок, так как ее чистота сохраняется относительно недолго.

Другие растворители для ГВЭЖХ должны быть квалификации «для УФ-спектроскопии» или «для жидкостной хроматографии». Производство ацетонитрила и метанола, а также воды таких квалификаций освоено нашей промышленностью. При хранении, а также использовании таких растворителей всегда следует помнить о потенциальных загрязнителях и по мере возможности избегать их.

Примеси, находящиеся в метаноле или ацетонитриле, точно так же могут накапливаться на колонке и проявляться в виде пиков при градиенте. Это легко понять, если представить себе, что начальный состав растворителя органический компонент — вода 50 : 50. Невыводимая таким растворителем примесь, например нафталин, может быть добавлена как в воду, так и в метанол и будет накапливаться в начале колонки одинаково независимо от компонента системы растворителей, ее содержащего (метанола или воды). Если спустя какое-то время начать градиентное элюирование, нафталин при более сильном растворителе начнет двигаться и выйдет в виде узкого пика.

Наиболее жесткие требования предъявляют к растворителю если градиент осуществляется с детектированием при длинах волн ниже 220 или 210 нм, так как в этом случае поглощают и проявляются в виде пиков многие примеси, УФ-прозрачные при 254 или 280 нм.

Единственным путем установления пригодности растворителей для ГВЭЖХ служит проверка в реальных хроматографических условиях с градиентом требуемого состава, но без введения пробы вещества (холостой градиент). Как правило, проверку проводят сначала на более грубых шкалах детектора и при длинах волн 254 или 280 нм, а при получении положительного результата переходят на более чувствительные шкалы и длины волн 220 нм и ниже. Если работа по ГВЭЖХ прервана на относительно большой срок (более недели) или один из растворителей (или оба) заменены на новые (даже той же квалификации и партии), всегда следует до начала работы с образцами создать холостой градиент для проверки работоспособности системы в целом.

Следует отметить, что многие добавки к растворителям, такие, как соли, кислоты, ион-парные и другие реагенты, способны заметно изменить свойства растворителей. Так, накопление полифосфатов в солях фосфорной кислоты, используемых для приготовления буферных растворов, приводит к существенному дрейфу при градиенте из-за сильного УФ-поглощения полифосфатов. В некоторых случаях удается уменьшить дрейф в градиентном режиме, если уравнивать УФ-поглощение слабого и сильного

элюирующих растворов добавкой УФ-поглотителя, такого, как ацетон, к менее УФ-поглощающему раствору. Градиент тем легче осуществить, чем он меньше по диапазону, поэтому целесообразно менять растворитель по составу только в тех пределах, которые необходимы для разделения. Это позволяет повысить чувствительность, уменьшить дрейф нулевой линии и количество ложных пиков, а также ускорить как элюирование, так и возврат системы к исходным условиям для нового анализа.

Если при градиентном элюировании используют другой тип детектора, например флуориметрический, высокие требования к чистоте растворителей остаются, но меняется их направленность — не должно быть флуоресцирующих примесей. О пригодности растворителей для работы судят также, осуществляя холостой градиент.

В заключение отметим, что к градиентному элюированию следует прибегать только в тех случаях, когда его применение является единственным путем решения данной проблемы. Если проверка в градиентном режиме показала, что возможно использовать изократический вариант для интересующих веществ, следует немедленно перейти к нему. Это всегда выгодно, даже в тех случаях, когда анализ разбивается на два изократических, выполняемых на двух приборах с более сильным и более слабым растворителями. Более воспроизводимые результаты и возможность использовать более чувствительные шкалы, менее жесткие требования к качеству растворителя — это только некоторые из получаемых преимуществ.

Следует также отметить, что при работе в обращенно-фазном режиме с системой метанол — вода, вязкость которой не аддитивна, а меняется от 1 до 1,5 и затем до 0,6 Мпа•с при переходе от 100% воды к 100% метанола, колонка находится в неблагоприятных условиях, так как при постоянном расходе давление на колонку сначала возрастает в 1,5 раза, а затем падает в 2 раза к концу градиентного элюирования. Картина повторяется в процессе регенерации колонки, при возврате к слабому растворителю. Это сокращает срок службы колонки и затрудняет работу с колонками, содержащими мелкий сорбент (менее 5 мкм).

3.4. ВЭЖХ С ПОЛУЧЕНИЕМ ПРОИЗВОДНЫХ ДО И ПОСЛЕ КОЛОНОЧНОГО РАЗДЕЛЕНИЯ

Использование не самого образца, а его производных в жидкостной хроматографии позволяет увеличить чувствительность и селективность метода. Иногда для получения производных необходимо предварительное концентрирование образца. Для многокомпонентных смесей обычно требуется предварительное разделение на более простые по составу фракции, чтобы исключить перекрытие зон в конечной хроматограмме или удалить примеси, влияющие на характеристики колонки. Некоторые соединения не обладают способностью поглощать свет, и для их определения с помощью высокочувствительных фотометрического или флуориметрического детекторов необходимо получить производные, регистрируемые этими детекторами. Присоединяя способную к флуоресценции группу к окси- или аминогруппе образца, можно обнаружить очень малые концентрации флуоресцирующих веществ.

Производные, полученные из экстрактов биоматериалов, имеют значительно меньшую полярность компонентов, что позволяет существенно изменить время их выхода и отделить от общей массы полярных соединений. Большинство реактивов, применяемых для модификации, реагирует с полярными группами образца, уменьшая его полярность. Уменьшение полярности полученных производных дает возможность применять адсорбционную хроматографию, а не обращенно-фазную, и легко отделить вещество от не вступивших в реакцию соединений. Полученные менее полярные производные экстрагируют и вводят в хроматограф. Таким образом очищают сложные загрязненные образцы фармацевтических или сельскохозяйственных препаратов, а также биохимические субстраты: мочу, плазму, сыворотку, кровь.

Чтобы разработать хороший способ модификаций, необходимо знать химическую структуру образца. Производные подбираются так, чтобы добиться хорошего отклика флуоресцентного или фотометрического детектора. Обработанный образец вводят в хроматограф для получения конечного разделения. Производные получают в тех случаях, когда необходимо:

- 1) отделение от матрицы интересующего нас соединения;
- 2) улучшение разделения за счет снижения полярности или изменение значений α выбранных пар компонентов;
- 3) повышение отклика детектора на конкретные компоненты образца;
- 4) изменение отклика детектора на различные компоненты образца, в результате чего могут количественно оцениваться интересующие нас вещества даже при наличии перекрывающихся зон не интересующих нас соединений. Две последние причины наиболее актуальны. Производные получают и в случае нестойких веществ, которые могли бы разложиться в хроматографе. Так обрабатывают арилгидроксиламины метилизоцианатом, переводя их в карбамиды.

Общие аспекты получения производных в жидкостной хроматографии в целях повышения чувствительности подробно рассмотрены в литературе. Производные могут быть получены до введения вещества в колонку и после разделения его на хроматографической колонке перед прохождением детектора.

3.4.1. Получение производных до введения вещества в колонку

Производные до введения вещества в колонку получать легче. Реакцию и очистку вещества обычно проводят вне хроматографа. Этот процесс может быть медленным, одноэтапным и многоэтапным, причем нет никаких ограничений при проведении реакций. Применяют любой растворитель или смесь растворителей, продолжительность реакции не ограничена. Реагент берут в избытке и удаляют перед введением в хроматограф, причем возможен широкий выбор реагентов.

Производные можно получать для многих классов органических соединений, если предварительно проводить химическое превращение интересующих нас веществ в соединения, способные давать производные. Например, гидролиз сложных эфиров приводит к получению кислот и спиртов. Уменьшение полярности производных по сравнению с таковой в исходном образце приводит к двум важным следствиям: менее полярные вещества регистрируются в виде более острых пиков с большим числом теоретических тарелок, у них уменьшается разброс значений k' и появляется возможность разделения в изократическом режиме вместо градиентного. У полученных производных выше значения α для выбранных пар веществ. Описаны производные, чувствительность определения которых на электрохимическом детекторе очень высока. Некоторые реагенты, применяемые для получения производных, приведены в табл. 3.2.

Получение производных до колонки имеет следующие недостатки. Некоторые образцы дают более одного продукта реакции для одного конкретного вещества и, следовательно, два или больше пиков на хроматограмме для индивидуального вещества. Реакция не всегда протекает полностью или доопределенного предела для каждого анализируемого образца. Наконец, управление ходом реакции вручную может оказаться трудоемким и связанным с большой потерей времени, чего не наблюдается при автоматическом режиме получения производных после колонки.

Некоторые фирмы выпускают специальное оборудование для получения производных в автоматизированном режиме, на котором можно проводить операции растворения, экстракции, обработки реагентами, повторной экстракции, фильтрации, выпаривания с растворением осадка другим растворителем и т.д.

3.4.2. Получение производных после разделения в колонке

Реакция сводится к получению производных уже разделенных зон образца. Обычно требуется тщательный подбор аппаратуры и реагентов. Этот метод был применен Стайном и Муром для анализа аминокислот, не имеющих окраски. Аминокислоты после выхода из колонки взаимодействуют с нингидрином, превращаясь в окрашенные соединения, способные поглощать свет на длине волны 570 нм и обнаруживаемые фотометром. Принципиальная схема установки для получения производных после колонки приведена на рис.3.1.

Имеются следующие отличия этого метода от метода получения производных до колонки:

- 1) могут использоваться для одновременного обнаружения два детектора;
- 2) скорость реакции должна быть большой;
- 3) реактив не должен обнаруживаться детектором;
- 4) использование элюента может мешать выбору реагентов из-за нерастворимости или возможной реакции;
- 5) обнаруживаемые вещества могут распадаться и разрушаться.

Таблица 3.2. Реагенты, способствующие улучшению условий обнаружения за счет получения производных образца до колонки

Реагент	Обрабатываемые компоненты образца	Необходимость предварительной обработки и образца*	Характеристики производных образца			Литература
			λ_1^{**}	λ_2	$\varepsilon^{***} \cdot 10^{-4}$	
<i>n</i> -Бромфенацилбромид	Карбоновые кислоты	Да	260		1,8 (254)	[71] [75]
<i>N</i> -Сукцинимидил- <i>n</i> -нитрофенилацетат	Карбоновые кислоты	?	265		0,62 (254)	[75]
1-(<i>n</i> -Нитро)бензил-3- <i>n</i> -толилтриазин	Карбоновые кислоты	Нет			0,62 (254)	[71]
3,5Динитробензол-хлорид	Спирты, амины, фенолы	-			1,0 (254)	[71] [75]
Хлорангидрид пировиноградной кислоты	Фенолы, амины, спирты, меркаптаны	-				[76]
<i>n</i> -Иодбензолсульфонилхлорид	Фенолы, спирты	Да				
Бензоилхлорид	Спирты	-	230		1,3 (230)	[76]
<i>n</i> -Нитробензоилхлорид	Спирты	-	254		1,0	[71]
<i>n</i> -Метоксибензоилхлорид	Амины	Да	254		1,5	[77]

<i>n</i> -Нитробензоилгидроксиламинхлорид	Альдегиды, кетоны	?	265		0,62 (254)	[75] [78]
Реагент	Обрабатываемые компоненты образца	Необходимость предварительной обработки и образца*	Характеристики производных образца			Литература
			λ_{1}^{**}	λ_{2}	$\varepsilon^{***} \cdot 10^{-4}$	
2,4-Динитрофенилгидрозин	Альдегиды, кетоны	Да	430		2,0 (430)	[75] [79]
	Амины	?	265		0,62 (254)	[75]
2,4-Динитро-1-фторбензол	Амины	Да	360			[71]
Данзилхлорид(5-N,N-диметиламинафталин-1-сульfoxлорид)	Амины, аминокислоты, пептиды, фенолы	-	360	510		[71]
Пиридоксаль	Аминокислоты	-	330	400		[71]
<i>n</i> -Нитробензилметиламин	Изоцианты	-	265		0,62 (254)	[80]
Фенантренборная кислота	1,2-, 1,3- или 1,4-диоли	-	313	385		[81]

* «Да» означает, что обработанный образец может непосредственно вводиться в хроматограф. При использовании флуориметрического детектора λ_1 соответствует максимуму возбуждения (первичная), а λ_2 — максимуму эмиссионного излучения (вторичная).

** Для фотометрического обнаружения указана длина волны, соответствующая максимальному поглощению света.

*** Число в скобках, соответствует длине волны λ_2 , для которой указана ε .

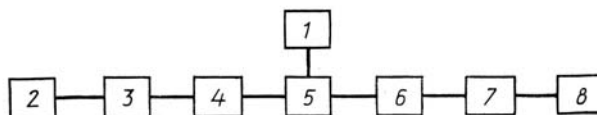


Рис. 3.1. Схема установки для получения производных после колонки:

1—насос, подающий реактив; 2—насос для подачи пробы; 3—колонка; 4—первый детектор (не обязателен); 5 — тройник; 6 — реактор; 7 — второй детектор; 8—спираль, создающая противодавление

Требуется тщательное конструирование узлов оборудования, поскольку эффекты размывания зоны вне колонки могут быть значительными. Некоторые реагенты для получения производных после колонки приведены в табл. 3.3. Продолжительность

реакции должна быть не более 20 мин во избежание большого внеколоночного размывания. Другим ограничением почти для всех видов реакций является преобладание воды в окончательной смеси, и поэтому хроматографирование проводят лишь с водными подвижными фазами или с растворителями, смешивающимися с водой. Некоторые реагенты, приведенные в табл. 3.3, применимы и для получения производных до колонки.

Конструкция системы с получением производных после колонок должна обеспечить смешение вытекающей из колонки жидкости с реагентом и выдержку при некоторой температуре T в течение такого-то времени t . Для обеспечения выдержки в период t на участке между колонкой и кюветой детектора возможны три подхода:

- 1) применение короткого отрезка капиллярной трубки, позволяющей проводить реакцию за 10—30 с;
- 2) использование короткой колонки, наполненной стеклянными шариками небольшого диаметра (выдержка до 3 мин);
- 3) использование сегментированного потока, что улучшает перемешивание и увеличивает продолжительность выдержки до 20 мин.

Следует также учесть, что реагенты и подвижная фаза должны быть смешиваемы, что размывание зон вне колонки увеличивается при использовании более вязких реакционных смесей и при увеличении времени реакции. Для предотвращения этих явлений часто предпочитают проводить реакцию при повышенных температурах.

При протекании быстрых реакций в несегментированном потоке в коротких трубках основное — это смешение реакционной смеси до ее поступления в кювету детектора. Для смешения применяют специально сконструированные тройники, на выходе которых устанавливают свернутую в спираль трубку («смесительная спираль»). Обычно применяют тефлоновые спирали с внутренним диаметром от 0,2 до 0,5 мм и длиной 10 м. Некоторые производные могут быть получены и без добавления реагента, непосредственно в хроматографе за счет фотохимической реакции.

Таблица 3.3. Реагенты, взаимодействующие с образцом, после прохождения его через колонку (непосредственно перед детектором в ВЭЖХ)

Реагент	Обнаруживаемые вещества	Примечание
Флуорескамин (флурам)	Амины, аминокислоты, пептиды	Быстрая реакция, очень быстрое обнаружение по флуоресценции
Ортофталевый альдегид	Амины, аминокислоты	Быстрая реакция, очень быстрое обнаружение по флуоресценции
Нингидрин	Амины, аминокислоты	Продолжительность реакции 1 мин. При 140° длины волн поглощения образующих соединения 440 и 570 нм
о-Нитрофенол (натриевая соль)	Карбоновые кислоты, другие кислоты	Быстрая реакция, обнаружение образующих соединений по поглощению свет на длине волн 432 нм
2,4- Динитрофенил-гидразин	Альдегиды, кетоны	Продолжительность реакции 3 минуты; обнаружение по поглощению света на длине волны 430 нм

Ce ⁴⁺	Фенолы, углеводы, карбоновые кислоты, другие окисляемые органические вещества	Продолжительность реакции и температура для различных веществ попадают в диапазон от приемлемых до предельно допустимых значений; обнаружение по флуоресценции
Фермент плюс субстрат (субстраты)	Ингибиторы ферментов (например фосфорорганические и карбаматные инсектициды)	Реагент может быть очень чувствительным и специфическим
Реагент	Обнаруживаемые вещества	Примечание
Субстраты для выбранного фермента	Любой фермент (например лактатдегидрогеназа, креатинкиназа, щелочная фосфатаза)	Реагент может быть очень чувствительным и специфическим
Реактив Грисса (раствор сульфаниловой кислоты и α-нафтиламина в разбавленной уксусной кислоте)	Нитриты, нитрозамиды, нитрозокарбаматы, алкилнитриты	Продолжительность реакции 3 мин., обнаружение по поглощению света на длине волны 550 нм
Фотохимическая реакция вытекающей из калонки жидкости	Каннабиноиды	Используется соответствующая длина волны облучающего света для селективного преобразования компонентов образца во флуоресцирующие производные
феррицианид	Сахар, другие окисляемые вещества	Производное феррицианида обнаруживается электрохимическим детектором
Неокупроин	Сахара	Продолжительность реакции 3 – 15 мин при 97 С°
5,5' – Дитио – (2 – нитробензойная кислота)	Тиолы, ферменты, несущие SH-группы	Быстрые реакции, обнаружение по поглощению света на длине волны 412 нм
Ителендиамин-гексацианоферрат	Катехоламины	Продолжительность реакции 5 мин при 75 С°; обнаружение по флуоресценции на длине волны 400 (I) и 510 нм (II)
9,10-Фенантренхинон	Гуанидины	Продолжительность реакции 2 мин при 60 С°; флуориметрическое обнаружение на длине волны 380 (I) и 450 нм (II)
Изоникотинил-гидразин	3-Китостероиды	Продолжительность реакции 2 мин при 70 С°; флуориметрическое обнаружение на длине волны 360 (I) и 450 нм (II)

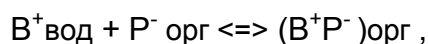
3.5. ИОН-ПАРНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Ион-парная хроматография давно находила применение в жидкостной хроматографии и экстракции для извлечения лекарств и их метаболитов из биологических жидкостей в органическую фазу. Как самостоятельный раздел ВЭЖХ ион-парная хроматография, называвшаяся также экстракционной, парно-ионной, хроматографией с использованием ПАВ, хроматографией с жидким ионообменником, стала развиваться с середины 70-х годов. Метод занимает промежуточное положение между ионообменной хроматографией и адсорбционной, распределительной или обращенно-фазной. Недостатки ионообменных материалов, а именно невозпроизводимость от партии к партии, меньшая активность и стабильность по сравнению с другими сорбентами и небольшой выбор наполнительного материала, исключающий изменение селективности за счет сорбента, привел к некоторому ограничению применения ионообменной хроматографии. В ион-парной хроматографии большинство этих недостатков можно преодолеть. Метод ион-парной хроматографии характеризуется универсальностью и обладает преимуществом по сравнению с классической ионообменной хроматографией, в котором активные центры фиксированы. Вследствие более быстрой массопередачи в ион-парной системе хроматографическое разделение более эффективно, чем на ионообменнике с фиксированными и активными зонами.

Ион-парную хроматографию используют для разделения образцов, содержащих как ионные, так и неионные соединения. Ее применяют в тех случаях, когда трудно или невозможно получить приемлемое разделение образца методом ионообменной хроматографии адсорбционной или обращенно-фазной. В некоторых случаях ионные соединения можно разделить на обращенной фазе, придавая им свойства неионных соединений (подавление ионов) с помощью буферного раствора с соответствующим рН, при котором равновесие смещается в сторону образования неионизированной формы. Полярные вещества, обладающие липофильными свойствами, делятся при этом на обращенной фазе как неполярные. Однако большинство наполнительных материалов колонок надежно работает только при рН=1,5—7,5. Исключение составляет партисил 5 ОДС, работающий при рН=1—8,5. В этом диапазоне рН сильные кислоты и основания ионизированы.

Попытки разделения сильных кислот и оснований методом подавления ионов оказываются неудачными из-за плохого удерживания веществ и асимметрии пиков. Соединения, остающиеся ионизированными в интервале рН=2—8, удовлетворительно разделяются методом ион-парной хроматографии, когда в подвижную фазу добавляют противоион, заряд которого противоположен заряду молекулы, и создается ион-парный комплекс, обладающий свойствами неполярного вещества. Если к ионному соединению, растворимому только в воде, добавить противоион, то образуется ионная пара, которая, обладая свойством растворяться в органической фазе, распределится между водным и органическим слоем. Возможна также адсорбция липофильной части противоиона в углеводородной фазе наполнительного материала. Очевидно, что катионы будут хорошо экстрагироваться анионами, и наоборот.

Таким образом, ионизированные молекулы находятся в равновесии и образуют ионную пару: растворенное вещество—противоион, причем все равновесия имеют концентрационные зависимости. В упрощенном виде распределительное равновесие может быть представлено в виде



где B^+ — протонированная форма основания, которое нужно экстрагировать;
 P^- — анион кислоты, который применяют для образования ионной пары.

Ионная пара В+Р- будет растворяться в полярной органической фазе, например в смеси спирта с хлороформом, а ионные формы будут растворяться в воде. Для определения ароматических сульфокислот применяют в качестве противоиона тетрабутиламмоний, а для анализа хинина—сульфокислоты камфоры. В качестве противоиона обычно используют четвертичные или третичные амины, соли сульфокислот. Наиболее часто применяют тетраметил, тетрабутил, пальметилтриметиламмоний для анализа кислот, сульфированных красителей и третичные амины типа триоктиламина для анализа сульфонов. Противоионами для анализа оснований являются соли алкил- и арилсульфокислот, перхлораты, пикраты.

Существует четыре варианта ион-парной хроматографии:

- 1) адсорбционная хроматография, когда ионные пары вымываются элюентом с силикагеля;
- 2) нормально-фазная распределительная хроматография, когда вода, нанесенная на пористую подложку, является неподвижной фазой, органический растворитель—элюентом;
- 3) обращенно-фазная распределительная хроматография с органическим растворителем в качестве неподвижной фазы и водой в качестве элюента;
- 4) обращенно-фазная хроматография, когда гидрофобный ион, образующий ионную пару, адсорбируется углеводородной частью неподвижной фазы. Иногда добавляют ПАВ, например цетилтриметиламмонийбромид (цетримид).

Ион-парную хроматографию применяют и для разделения амфотерных веществ. Когда ион-парную хроматографию применяют в нормально-фазном варианте в качестве противоионов, иногда используют ионы, способные к абсорбции света или к флуоресценции, для улучшения идентификации некоторых не поглощающих свет соединений. В этом варианте ион-парной хроматографии селективность системы изменяется за счет изменения полярности органической фазы. В табл. 3.4 приведены примеры использования ион-парной хроматографии при работе в режиме нормально-фазной хроматографии.

Однако наиболее часто применяют ион-парную хроматографию на обращенной фазе, при которой в качестве подвижной фазы используют водный буферный раствор и органический растворитель, смешивающийся с водой, обычно метанол или ацетонитрил. В подвижную фазу добавляют противоион, заряд которого противоположен заряду молекулы, а в качестве сорбента используют силикагель с химически привитой фазой, обычно C_8 или C_{18} . Иногда разделение осуществляют с применением несмешиваемой с водой механически удерживаемой фазы, например, бутанола. При разделении на обращенной фазе более стабильной, чем механически удерживаемая фаза, водные образцы могут непосредственно вводиться в колонку, что особенно важно для анализа биологических образцов. При этом нет необходимости в предварительной очистке, так как гидрофильные компоненты мгновенно вызываются из колонки. Градиентное элюирование проводят, изменяя концентрацию противоиона в подвижной фазе или меняя полярность растворителя. При изменении концентрации противоиона, который остается в неподвижной фазе, изменяется сила растворителя, а при изменении рН подвижной фазы изменяется селективность разделения.

Таблица 3.4. Примеры использования нормально-фазной ион-парной хроматографии

Неподвижная фаза (вода)*	Подвижная фаза	Противоион	Разделяемые соединения
рН=9,0	Циклогексан (хлороформ), пентанол	N,N-Диметилпро-триптилин**	Карбоновые кислоты

0,1 М НСlO ₄		Различные смеси трибутилфосфата, этилацетата, бутанола, СН ₂ Сl ₂ или гексана	СlO ₄ ⁻	Амины
НРО ₄ ²⁻ /буфер РО ₄ ³⁻		Бутанол (СН ₂ Сl ₂), гексан	(С ₄ Н ₉) ₄ Н ⁺	Карбоновые кислоты
Неподвижная фаза (вода)*	фаза	Подвижная фаза	Противоион	Разделяемые соединения
0,1 М НСlO ₄		СН ₂ Сl ₂ , СНСl ₃ , бутанол, пентанол	СlO ₄ ⁻	Амины
рН=5-6		СН ₂ Сl ₂ , и (или) СНСl ₃ ,	Пикрат **	Амины
рН=6—8,5		Бутанол, гептан	(С ₄ Н ₉) ₄ Н ⁺	Сульфонамиды
0,2— 0,25 М НСlO ₄		Бутанол (СН ₂ Сl ₂), Гексан	СlO ₄ ⁻	Амины и соли четвертичного аммония
0,1 М метансульфо- кислота		Бутанол (СН ₂ Сl ₂), Гексан	СН ₃ ЗО ₃ ⁻	Амины
рН=8,3		Бутанол (СН ₂ Сl ₂), Гексан	(С ₄ Н ₉) ₄ Н ⁺	Карбоновые кислоты
рН=7,4		СН ₂ Сl ₂ (СНСl ₃), бутанол и (или) пентанол	(С ₄ Н ₉) ₅ Н ⁺ (С ₄ Н ₉) ₉ Н ⁺ (С ₄ Н ₉) ₁₁ Н ⁺	Конъюгированные соединения глюкуронида и сульфатов

* Воде различными солями или противоионами приданы буферные свойства!

** Хромофорные противоионы, помогающие идентифицировать не поглощающие свет соединения.

От обычной обращенно-фазной хроматографии легко перейти к ион-парной на обращенной фазе, и наоборот.

Ион-парное разделение на обращенной фазе (табл. 3.5) может быть проведено несколькими методами:

- 1) на привитой к матрице неподвижной фазе, состоящей из углеводородов;
- 2) то же самое, но в качестве противоиона используют ПАВ;
- 3) на неподвижной фазе, состоящей из механически удерживаемой органической жидкости;
- 4) на неподвижной фазе, содержащей жидкий ионообменник.

Важным условием проведения ион-парной хроматографии является стабильность системы. Это означает в случае механически удерживаемой жидкости несмешиваемость водной и органической фаз, что достигается четким термо-статированием и предварительным насыщением подвижной фазы неподвижной. При работе с нормальной фазой при введении противоиона в неподвижную фазу необходимо предотвратить его унос неподвижной фазой за счет образования ионных пар, покидающих болонку. Противоион в этом случае добавляют в образец до введения его в хроматограф или в подвижную фазу. Поскольку в ион-парной хроматографии работают с полярными веществами, склонными к образованию хвостов, следует помнить, что в этом случае желательнее применить другую подвижную или неподвижную фазу, другой противоион. Необходимо, чтобы в ион-парной хроматографии при изменении концентрации не изменялось значение k' образца, что может повлечь образование хвостов. Водная фаза должна иметь постоянную концентрацию противоиона и pH. Обычно используют цитратный или фосфатный буферный раствор. Иногда противоион сам является буфером. В случае разделения при низких pH растворы сильных кислот обеспечивают достаточное буферное действие.

Интересно проследить роль противоиона в ион-парной обращенно-фазной хроматографии. Можно написать следующие уравнения для образца, имеющего анион и катион:

$$k' = (V_s/V_m)E(c^+), \quad k' = \{V_s/V_m\}E(c^-),$$

где E —константа экстракции конкретной ион-парной системы; (c^+) и (c^-) — концентрации анионного и катионного противоиона.

При прочих неизменных условиях E постоянна и, следовательно, повышение концентрации противоиона в подвижной фазе приводит к увеличению k' при разделении на обращенной фазе. В нормально-фазной ион-парной хроматографии k' также меняется за счет изменения концентрации противоиона в подвижной фазе. Значение k' может регулироваться типом противоиона, например, замена гептансульфокислоты пентансульфокислотой может изменить k' в 2—5 раз. Этот эффект ярко выражен при низких концентрациях противоиона. Крупные молекулы противоиона дают большие величины k' при ион-парном разделении на обычной фазе. Так, переход от тетра-этиламмония к тетрапентиламмонiu позволил изменить k' на несколько порядков.

Таблица 3.5. Примеры использования обращенно-фазной ион-парной хроматографии

Неподвижная фаза	Подвижная фаза (вода)*	Противоион	Разделяемые соединения
1. Силикагель – ODS**	0,1 M HClO ₄	ClO ₄ ⁻	Амины
Лихросорб – RO-2**	ацетонитрил pH=7,4	(Бутил) ₄ N ⁺	Карбоновые кислоты
μ - Бондапак C ₁₈ **	Метанол, pH=2-4	(Бутил) ₄ N ⁺	Красители

2. Силикагель – SAS** Силикагель – ODS**	Пропанол или CH ₂ Cl ₂ Метанол, H ₂ SO ₄	Гексадецил (СН ₃) ₃ N+ Додецил SO ₂ -	Сульфоокислоты Амины
3. Пентанол - 1	pH=7,4	(Бутил) ₄ N+	Карбоновые кислоты, сульфонаты
4. Бис(2-этилгексил) фосфорная кислота CHCl ₃ Три-п-октиламин	pH=3,8 0,05 M HClO ₄	Бис(2-этилгексил) фосфат (Октил) ₃ NH+	Фенолы Карбоновые кислоты, сульфонаты

* Воде различными солями или противоионом приданы буферные свойства.

** Обращенно-фазные сорбенты, используемые без добавления органической фазы.

Способность различных анионов экстрагировать ион тетра-булламмония из воды в хлороформ является мерой эффективности этих противоионов (табл. 3.6).

В тех случаях, когда вещество полностью ионизировано, изменение силы растворителя за счет изменения концентрации противоиона не влияет на селективность, и только когда вещество частично ионизировано или не ионизировано, селективность меняется при изменении концентрации противоиона.

В ион-парном разделении на обращенной фазе сила растворителя меняется за счет изменения полярности подвижной фазы. Увеличивая в смесях воды с метанолом или ацетонитри-лом содержание воды, мы увеличиваем силу растворителя и снижаем значение k' для образца. В ион-парной хроматографии в качестве подвижных фаз применяют бутанол, пентанол, метилхлорид и гексан. При этом более полярные растворители являются более сильными и дают самые низкие значения k' . Сила растворителя в ион-парной хроматографии зависит от его способности стабилизировать или растворять ионы и ионные пары, в отличие от фактора полярности растворителя P' , связанного с его способностью растворять полярные неионные вещества. Сила растворителя в ион-парной хроматографии зависит от параметра P' и от его диэлектрической проницаемости ϵ . Показателем относительной силы растворителя служит функция $P'+0,25 \epsilon$ (табл. 3.7).

Повышение ионной силы водной фазы приводит к уменьшению числа образующихся ионных пар из-за конкуренции буферных ионов с противоионом за образование ионной пары. Поэтому повышение ионной силы в ион-парной хроматографии приводит к снижению k' при разделении на обращенной фазе и к повышению k' при разделении на нормальной фазе. Влияние буферных ионов возрастает в последовательности: NO₂- < Br- < Cl- < SO₄²⁻-. Селективность растворителя в ион-парной хроматографии изменяется по тем же правилам, как и в случае распределительной жидкостной хроматографии.

Таблица 3.6. Эффективность различных анионов при экстракции иона тетрабулламмония из воды в хлороформ

Противоин	IgE	Противоин	IgE
Cl-	-0,11	Нафталин-2-сульфонат	3,45

Бензоат	0,39	ClO ₄ ⁻	3,48
Вг-	1,29	Пикрат	5,91
Толуол-4-сульфонат	2,33	Дипикриламин	9,6
Салицилат	2,42		

Таблица 3.7. Значение силы растворителей при нормально-фазной ион-парной хроматографии

Растворитель	R'	ε	R'+0,25ε
Тетрахлорид углерода	1,7	2,2	2,3
Бензол	3,0	2,3	3,6
Хлороформ	4,4	4,8	5,6
Метиленхлорид	3,4	8,9	5,6
Этилацетат	4,3	6,0	5,8
Метилизобутилкетон	3,5	13,1	6,8
1-Пентанол	3,6	14,7	7,3
1-Бутанол	3,9	17,5	8,3

Оптимальными при ион-парном разделении на обращенной фазе являются средние значения pH. При снижении pH подвижной фазы анионы X- начинают превращаться в неионизированные кислоты и число ионных пар образца в неподвижной фазе уменьшается, а следовательно, снижается и значение k'. Изменение pH оказывается мощным средством изменения селективности разделения. При высоких значениях pH значение k' также падает, что аналогично уменьшению обменной емкости, так как ионы OH- подвижной фазы начинают связывать противоионы и конкурировать с анионом образца в образовании ионных пар. Слабые кислоты или основания обычно не используют в качестве противоионов для ион-парной хроматографии.

При ион-парном разделении на нормальной фазе зависимость k' от pH обратна. Компоненты образца более сильно удерживаются при низких и при высоких значениях pH при условии, что неионизированные ионы образца не удерживаются водной фазой. Объем вводимого в ион-парной хроматографии вещества обычно не должен быть очень большим, чтобы не было размывания зон. Иногда ограничивающим фактором является

концентрация противоиона в подвижной фазе; повышая его концентрацию, можно увеличить максимальную концентрацию вводимого вещества. При повышении концентрации противоиона и соответственном изменении значений k' образца возможно одновременное добавление избытка нейтральной соли в водную фазу, что стабилизирует значение k' . Получаем закономерность, аналогичную закономерности влияния буферного раствора. Максимальное количество вводимого образца может быть повышено при добавлении образца в виде ионных пар. При этом до введения в хроматограф противоион смешивают с образцом, а pH доводят до нужного значения.

Влияние температуры имеет в ион-парной хроматографии большое значение. При использовании механически удерживаемых неподвижных фаз колонка должна быть термостатирована. В ион-парной хроматографии применяют обычно фазы с повышенной вязкостью, а повышение температуры снижает ее. Зависимость селективности от температуры также наиболее выражена в ион-парной хроматографии.

Применяя противоионы, поглощающие в УФ-области, можно получать при ион-парном разделении легко обнаруживаемые спектрофотометром ионные комплексы. Требуется, однако, чтобы противоионы не растворялись в органической фазе во избежание высокого поглощения выходящего из колонки раствора. Таким образом, используя ион пикрата или 2-нафтилсульфоната, можно обнаружить амины.

Одним из затруднений, наиболее часто встречающихся в ион-парной хроматографии, является нестабильность колонок, особенно в обращенно-фазном режиме. В колонках с обычной фазой наблюдается постепенный унос противоиона из неподвижной фазы, однако этого можно избежать, получая ионные пары до введения образца в хроматограф. Большим недостатком ион-парной хроматографии является образование хвостов. Причиной этого является либо диссоциация ионных пар, которая уменьшается при повышении концентрации противоиона, либо неправильная концентрация буферного раствора. Иногда удается уменьшить затягивание зон и увеличить эффективность разделения, перейдя от обычной ион-парной хроматографии к хроматографии с использованием поверхностно-активных веществ.

Такой способ разделения, по-видимому, пригоден для анализа очень полярных молекул, например сульфированных красителей. Длина углеродной цепи неподвижной фазы также варьируется в ион-парной хроматографии.

Воспроизводимость колонок в ион-парной хроматографии удовлетворительная в отличие от таковой в ионообменной хроматографии.

Ион-парную хроматографию обычно применяют для анализа физиологических и биологических жидкостей, полярных соединений и веществ с несколькими ионизируемыми группами, в том числе промежуточных продуктов красителей. Расфасованные реагенты для ион-парной хроматографии, состоящие из буфера и противоиона, которые можно непосредственно добавлять в подвижную фазу, выпускает фирма «Уотерс». К ним относится реактив А (0,005 М раствор тетрабутиламмонийфосфата, pH=7,5), реактив В-5 (0,005 М раствор пентансульфокислоты, pH=3,5) и реактив В-7 (0,005 М раствор гептансульфокислоты, pH=3,5).

При отсутствии четких литературных аналогий начинают разделение методом ион-парной хроматографии на обращенной фазе C_{18} с размером частиц 5—10 мкм. Наполнителем в ион-арной хроматографии с добавкой органической неподвижной азы является материал, используемый для обращенной фазы, при работе с нормальной фазой применяют обычный силикагель 5—10 мкм, как и в случае адсорбционной хроматографии. возможно применение нейтральных полистирол-дивинильных смол или смол ХАД. Колонки с C_{18} служат дольше в ион-парной хроматографии, чем колонки с неподвижной фазой, имеющей более короткую углеводородную цепь. Последующая после «привязывания» фазы силанизация улучшает свойства материала и увеличивает срок его службы (партисил 5 ОДС).

Для увеличения стабильности колонки pH следует уменьшать по мере увеличения концентрации противоиона.

Для этой же цели предложено использовать триэтиламин в качестве основания, так как этот реактив доступен, растворим, удобен в работе и обладает малой химической активностью. Предполагается, что сильные основания, так же как четвертичные гидроксиды, разрушают силикагелевую подложку. Подвижную фазу для ион-парной хроматографии желательно фильтровать через фильтр из стекловолокна, а после окончания работы колонку следует промывать пятикратным объемом элюента метанол — вода (50 : 50).

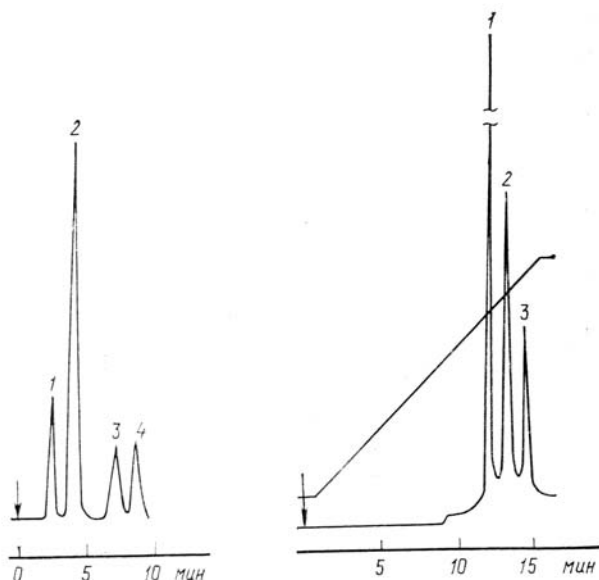


Рис. 3.2. Хроматограмма витаминов, полученная на колонке размером 300 X 4 мм с μ -бондапаком C_{18} , подвижная фаза — метанол — вода (70 : 30) с 0,1% В7 и В5 (1:1), расход 1 мл/мин, детектор—УФ (254 нм):
1— никотинамид; 2 — пиридоксин; 3 — рибофлавин; 4 — тиамин

Рис. 3.3. Хроматограмма изомеров фталевой кислоты, полученная на колонке размером 300 X 4 мм с μ -бондапаком C_{18} , подвижная фаза — вода с добавкой реактива А, метанол с добавкой реактива А, градиент от 5 до 40% метанола за 15 мин, скорость потока 2 мл/мин, детектор — УФ (254 нм):
1 — терефталевая кислота; 2 — ортофталевая кислота; 3 — изофталевая кислота

Необходимо, чтобы противоион растворялся в элюенте. Неправильный выбор противоиона может привести к образованию осадка, что вызовет возрастание значений k' , размывание пика и заметное повышение давления на входе. Концентрация обычно колеблется от 0,01 М для противоиона с малой длиной цепи до 0,005 М для противоиона с более длинной цепью.

Для препаративных разделений ион-парную хроматографию не применяют, а количество вводимого образца сопоставимо с количествами, применяемыми для распределительной хроматографии. Увеличение максимально вводимого количества может быть достигнуто за счет предварительного образования ионных пар в образце. Для некоторых ионизированных (независимо от рН) анионов и катионов не требуется добавка буфера. Кислоты обычно разделяются при рН=4—7,4, а основания — при рН=2—5. При этом значения рН подвижной фазы могут для улучшения селективности разделения варьироваться.

Следует помнить, что ион-парная хроматография на обращенной фазе в целом метод более грубый, чем разделение на обращенной фазе, и должен использоваться,

когда неприменимы распределительная хроматография на обращенной фазе или метод подавления ионов. Примеры ион-парного разделения приведены на рис. 3.2 и 3.3.

3.6. ЛИГАНДООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Лигандообменная хроматография основана на образовании координационных связей между сорбентом и разделяемыми ионами или молекулами. Лигандообменная хроматография применима только для разделения соединений, содержащих донорные гетероатомы или кратные связи. Ионы переходных металлов, находящиеся в неподвижной фазе, являются акцепторами электронов и легко вступают в координационное взаимодействие с электронодонорными атомами функциональных групп разделяемого соединения. Для проведения лигандного разделения необходимо наличие склонных к координации органических соединений и комплексообразующего катиона металла. Такое разделение характеризуется обратимостью процесса и высокой скоростью обмена лигандов. Лигандный обмен применяют в жидкостной колоночной, тонкослойной и газовой хроматографии, но наибольшие успехи были достигнуты в ВЭЖХ.

Лигандообменную хроматографию применяют для разделения в водной среде соединений, представляющих большой интерес для органической химии и биохимии: аминов, аминокислот, белков, нуклеотидов, пептидов, углеводов. При этом в качестве комплексообразующих используют ионы меди, цинка, кадмия, никеля, серебра и железа. Ионы ртути и серебра в неполярной среде алифатических углеводородов образуют лабильные комплексы с ненасыщенными и ароматическими углеводородами. Большими достоинствами лигандообменной хроматографии является ее селективность и отсутствие жестких требований к сорбенту, который может быть прочно связан ионами металла или только пропитан солями металла.

Аминокислоты занимают две координационные позиции, т.е. являются бидентатными лигандами, что резко повышает прочность их связывания за счет образования хелатного комплекса.

Лигандообменная хроматография оптически активных соединений основана на образовании лабильных координационных соединений, в которых с центральным ионом металла-комплексообразователя одновременно координирована молекула расщепляющего асимметрического реагента и один из подлежащих разделению энантиомеров. Для осуществления лигандообменной хроматографии необходимо наличие в расщепляющих реагентах и в разделяемых лигандах донорных гетероатомов серы, кислорода, азота, способных координироваться с ионом металла. Наблюдается хорошая координация α -аминокислот и ионов меди, цинка и никеля. Донорные атомы образуют плотно упакованную координационную сферу вокруг центрального иона металла, при этом разделяемые лиганды вступают в тесный контакт с расщепляющим реагентом. Этим и объясняется высокая эффективность распознавания реагента, т.е. энантиоселективность.

Такой принцип расщепления рацематов—лигандообменная хроматография—впервые был применен с использованием полистирольного сорбента, ковалентно связанного с остатками оптически активной природной аминокислоты L-пролина. Сорбент прочно координировал двухвалентную медь, оставляя в ее основной координационной плоскости две вакантные позиции для связывания подвижного лиганда молекулы L- или D-аминокислоты. Оказалось, что остаток L-пролина проявляет настолько высокое сродство к D-изомерам аминокислот, что последние пришлось даже вымывать из колонки раствором аммиака, который, координируясь с ионами меди, вытеснял подвижный лиганд из сорбционного комплекса, в то время как L-изомеры десорбировались водой.

Взаимодействием аминокислоты оптически активной аминокислоты с хлорметильной группой полистирола в присутствии иодида натрия синтезировано более 50 сорбентов, имеющих асимметрические атомы. Оказалось, что циклические аминокислоты пролин и оксипролин обладают максимальной энантиоселективностью и количественно расщепляют рацематы практически всех аминокислот, а также многие оксикислоты,

диамины, аминокислоты. Достоинством полистирольных асимметрических сорбентов являются высокая химическая стабильность, большая обменная емкость и возможность препаративного расщепления рацематов. Иногда за один цикл на 300 г сорбента удается расщепить до 20 г рацемата. Появились лиганд-дообменники с привитыми к силикагелю аминопропильным или полученным из него дитиокарбаматным радикалом.

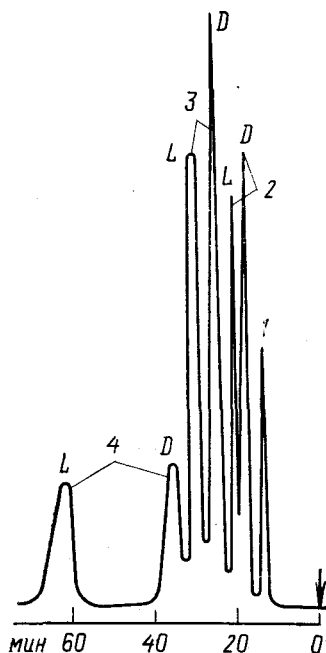


Рис. 3.4. Хроматограмма рацематов аминокислот, полученная на колонке размером 100X1 мм (стекло) с асимметрическим полистирольным анионитом (7,5 мкм), подвижная фаза — 0,25 М ацетат натрия и $1,5 \times 10^{-3}$ М ацетат меди, pH=5,2, детектор—УФ (260 нм): 1 — лизин; 2 — аланин; 3 — серин; 4 — лейцин

Лигандообменную хроматографию с успехом применяют для производства оптически чистых меченных тритием аминокислот.

Весьма важное применение лигандообменной хроматографии — быстрое разделение асимметрических энантиомеров без предварительного отделения от сопутствующих примесей. В лигандообменной жидкостной хроматографии в отличие от лигандообменной газовой хроматографии не требуется предварительное превращение энантиомеров в легколетучие соединения. Обычно в качестве сорбента применяют полистирол, к которому привит радикал оптически активного бензилзамещенного пропилендиамин.

Для сокращения времени анализа, повышения его чувствительности и точности требуется повышение эффективности колонки, что достигается за счет уменьшения частиц полистирольного сорбента. Перспективным является получение сорбентов для лигандообменной хроматографии на основе пористых силикагелей, химически модифицированных активными лигандами. Поверхность силикагеля связывается через n-пропиленовые мостики с L-оксипролиновыми лигандами.

В настоящее время создано и испытано около десятка асимметрических силикагелевых сорбентов. Хотя в большинстве сорбентов использованы оптические изомеры пролина и оксипролина, они различаются сродством к различным аминокислотам и порядком их элюирования; это связано с тем, что подвижный лиганд фиксируется в комплексе не только координацией карбоксильной и аминогруппой с ионом меди, но и взаимодействием бокового радикала аминокислоты с ближайшим окружением координационного центра, что определяет в конечном итоге порядок удерживания антиподов аминокислот сорбенте.

Поскольку сорбенты для лигандообменной хроматографии выпускаются, предложены некоторые модификации метода, позволяющие использовать традиционные сорбенты. Так, N-алкилированные оптически активные аминокислоты сорбируются на обращенно-фазном силикагеле. В алкильном радикале должно быть больше 5—6 углеродных атомов. В этом случае модификатор прочно удерживается на сорбенте и не смывается водным элюентом, в который добавляют следовые количества меди.

Разделение рацематов α -аминокислот методом лигандообменной хроматографии показано на рис. 3.4.

3.7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОПРИМЕСЕЙ

3.7.1. Общие положения

ВЭЖХ является надежным методом анализа микропримесей—веществ с концентрацией 0,01 %.

В жидкостной хроматографии применяют селективные детекторы (амперометрический, флуориметрический и др.), способные детектировать очень малое количество вещества. Очистка образца до ввода в жидкостной хроматограф минимальна, Циередко его вводят без предварительной обработки, и без получения производных, что часто невозможно при применении других методов анализа. Наконец, в жидкостной хроматографии возможно создание уникального диапазона селективных взаимодействий за счет изменения подвижной фазы, что значительно улучшает разрешающую способность всей хроматографической системы. Работа с микропримесями налагает ряд требований на весь процесс разделения. Особенное значение имеет разрешающая способность колонки, выбор детектора, предварительная обработка образца и построение калибровочного графика. Правильный выбор условий хроматографирования позволяет повысить чувствительность, надежность и воспроизводимость результатов, что очень актуально при работе с микропримесями.

3.7.2. Предварительная подготовка образца и его ввод в хроматограф

Перед анализом микропримесей для повышения чувствительности желательно провести концентрирование соединения методами, описанными в соответствующем разделе. Предпочтительно применять оборудование, позволяющее проводить автоматическую предварительную обработку образца, в том числе экстрагирование, измельчение, фильтрацию и автоматический ввод в хроматограф.

Для получения высокой чувствительности нужно вводить максимально возможный объем образца. При работе в изократическом режиме на высокоэффективных аналитических колонках оптимальный объем образца составляет от 100 до 500 мкл. Ввод большого объема разбавленного образца позволяет компенсировать относительно низкую чувствительность некоторых детекторов для жидкостной хроматографии.

При небольших количествах образца анализ проводят на колонках с внутренним диаметром 1—2 мм, что уменьшает его расход. Используя в качестве растворителя пробы слабый растворитель, можно наносить на колонку большие объемы образца. При этом он накапливается на входе в колонку, так как k' для компонентов образца велико и в колонке происходит концентрирование микропримесей, что значительно повышает чувствительность обнаружения. Пользуясь этим приемом, можно обнаружить некоторые малополярные органические соединения, например ароматические углеводороды, присутствующие в виде микропримесей в сточных водах, на колонке с обращенной фазой.

Для обеспечения наибольшего концентрирования растворитель пробы должен быть по возможности слабым, например, содержать 90—95% воды. В дальнейшем для элюирования пробы силу подвижной фазы резко увеличивают. Концентрирование на

колонке позволяет в некоторых случаях вводить 1 л и более образца при конечном объеме зоны интересующего нас вещества менее 50 мкл (градиентное элюирование), т.е. концентрировать вещество в 20 000 раз. Можно повысить чувствительность обнаружения, проводя концентрирование образца и вне колонки, например, выпаривая растворитель. Однако надо быть уверенным, что при этом не происходит потеря или видоизменение примесей. Кроме того, при таком процессе значительно повысится содержание основных компонентов в образце, что приведет к перегрузке по ним колонки и затруднит анализ. Вещества, удерживаемые сильнее, чем примеси, могут быть после анализа, удалены из колонки не только за счет повышения силы растворителя, но и путем обратной промывки колонки.

3.7.3. Разрешающая способность колонки

Иногда удается провести разделение на обращенной фазе таким образом, что основные компоненты образца элюируются со временем, близким к t_0 , а микропримеси удерживаются на колонке, что облегчает их количественное определение. Оценка содержания микропримеси наиболее надежна, когда ее пик регистрируется до пика преобладающего в образце компонента. Элюирование пика микропримеси на хвосте преобладающего компонента сильно ухудшает ее количественное определение. Любое хроматографическое разделение на колонке приводит к разбавлению образца. При анализе микропримесей возникает проблема разделения при минимальном разбавлении. Степень разбавления введенного образца может быть выражена уравнением

$$C_{\text{макс}}/C_0 = V_s N^{0,5} / [V_R (2\pi)^{0,5}],$$

где $C_{\text{макс}}$ — Концентрация, соответствующая максимуму пика; C_0 — исходная концентрация в образце; V_s — вводимый объем; N — число теоретических тарелок для данной колонки; V_R — удерживаемый объем микропримеси.

Из уравнения видно, что снижения степени разбавления, а значит, увеличения чувствительности определения микропримеси можно достигнуть за счет увеличения вводимого объема, использования колонки с большим числом теоретических тарелок или за счет снижения объема удерживания микропримеси. К увеличению N ведет применение эффективных колонок, заполненных частицами с размером менее 10 мкм. При анализе микропримесей желательнее применение коротких колонок (5—10 см) с размером частиц 3—5 мкм.

Большое влияние при анализе микропримесей оказывает изменение селективности системы и повышение коэффициента разделения α , что достигается изменением состава подвижной фазы и выбором оптимального хроматографического режима. Кроме того, как видно из уравнения

$$C_{\text{макс}}/C_0 = (\alpha - 1) / \alpha$$

изменение селективности может значительно снизить степень разбавления пика.

3.7.4. Детекторы

При анализе микропримесей работают с селективными детекторами, чувствительными к интересующему веществу. Предельная чувствительность детектора зависит от отношения сигнала к шуму самого детектора и от его способности реагировать на микропримеси в образце. Перед выполнением анализа необходимо эти микропримеси идентифицировать. Наиболее часто при анализе микропримесей применяют высокочувствительные фотометрические детекторы, работающие в УФ-области, и

спектрофотометры. УФ-фотометры, имеющие чувствительность более 0,002 е.о.п. на всю шкалу при шуме 1%, позволяют обнаруживать нанограммовые количества веществ, умеренно поглощающих в УФ-области, а флуориметры — даже пикограммовые. Для достижения максимальной чувствительности желательно работать при длине волны, соответствующей максимуму поглощения в УФ-спектре вещества. Получение соответствующих производных после колонки повышает селективность анализа и позволяет проводить его при максимальной предварительной очистке образца.

Примеси, способные к окислению или восстановлению в электролите, наиболее целесообразно определять чувствительными электрохимическими детекторами.

3.7.5. Калибровочные графики

При количественном анализе микропримесей не так важна высокая точность измерений, как их надежность, что достигается получением зон, свободных от посторонних соединений. Так как точность около 10% считается вполне удовлетворительной, пики можно оценивать по их высоте, меньше зависящей от четкости отделения микропримеси от соседних зон, пики которых могут накладываться на пики анализируемых микропримесей. Хотя оценка по площадям пиков более точна, калибровка по высоте пиков удобнее.

В ВЭЖХ калибровочные графики микропримесей обычно линейны и проходят через начало координат. Чтобы избежать возможных частичных потерь образца, проводят калибровку методом внутреннего стандарта (по соотношению высот пиков), причем внутренний стандарт известной концентрации добавляют до предварительной обработки образца. В этом случае потери учитывают за счет эквивалентного изменения концентрации внутреннего стандарта и образца. Стандартный образец, близкий по свойствам микропримеси, добавляют, когда трудно выделить анализируемое вещество в чистом виде, чтобы построить калибровочный график. Подробнее калибровка по методу внутреннего стандарта рассмотрена в гл. 10.

При анализе сложных смесей, в частности в тех случаях, когда наблюдаются эффекты влияния матрицы или когда получение в чистом виде исходного образца, для которого строится калибровочный график, затруднительно, применяют метод добавления стандарта. Наличие других компонентов в образце может влиять на степень удерживания и (или) высоту пика интересующего вещества. Метод добавления стандарта состоит в следующем. Образец разделяют в хроматографе и измеряют высоту h_x интересующего пика. После этого добавляют известное весовое количество W_x вещества X и повторяют разделение, определяя высоту пика h'_x вещества X. Для вещества X строят калибровочный график и, определив калибровочный коэффициент $S_x = (h'_x - h_x) / W_x$, вычисляют количество вещества X в исходном образце как h_x / S_x . Для проверки линейности графика берут несколько значений W_x . Метод добавления стандарта не обеспечивает поправки на нестабильность базовой линии, на помехи со стороны других компонентов и т.д. Эти помехи должны быть выявлены до добавления стандарта.

Методом, альтернативным методу добавления стандарта, является получение образца без анализируемого вещества и использование этого образца как матрицы для подготовки стандартов при обычной калибровке.

При определении микропримесей нужно придерживаться следующих рекомендаций.

1. Проводить предварительное концентрирование образца, а в ряде случаев и предварительную его очистку.
2. Использовать большие объемы образца и короткие эффективные колонки, заполненные частицами сорбента менее 10 мкм, особенно микроколонки.
3. Применять наиболее чувствительные детекторы с высоким отношением сигнала к шуму.
4. Применять хроматографические системы, обеспечивающие высокую разрешающую способность для микропримесей ($\alpha > 1,2$) при относительно низких значениях k' (0,5—1,5).

Если это возможно, то разделение следует проводить в обращенно-фазном варианте, когда основной компонент выходит в зоне t_0 .

5. Калибровку проводить по высоте пиков.

ГЛАВА 4

СОРБЕНТЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Сорбенты, используемые для ВЭЖХ, делят на несколько групп, каждая из которых, в свою очередь, подразделяется на типы. Классификация сорбентов может основываться на ряде признаков. Общепринятым является разделение сорбентов на группы по химической природе матрицы (основы) сорбента, а по типам — по методу химической обработки матрицы, делающей ее пригодной для использования в определенном виде хроматографии.

Основными группами сорбентов являются: 1) поверхностно-пристые сорбенты, представляющие собой непроницаемое для растворителя твердое ядро из стекла, на поверхность которого занесен тонкий слой пористого абсорбента, обычно силикагеля; 2) пористые сорбенты на основе силикагеля; 3) пористые сорбенты на основе оксида алюминия; 4) пористые сорбенты на полимерной основе.

Сорбенты первой группы были исторически первыми, стимулировавшими быстрый рост ВЭЖХ. Они представляют собой стеклянные микрошарики размером 35—50 мкм, на поверхности которых различными способами закрепляется слой силикагеля или оксида алюминия толщиной в 1—2 мкм. Этот слой может либо использоваться для разделения методом адсорбционной хроматографии, либо модифицироваться нанесением подвижной фазы. Нанесение фазы возможно динамическим методом из растворителя, методом испарения раствора фазы, как в ГХ; наноситься могут индивидуальные вещества или же полимеры; наконец, фазами могут служить химически привитые пленки как в виде монослоев (щеточные сорбенты), так и в виде полимерных пленок разной толщины.

Создание этих сорбентов, называвшихся также пелликулярными, позволило заполнять сухим способом достаточно длинные эффективные колонки и проводить разделения разного типа достаточно быстро. Обычно эффективность составляла для колонок длиной 1—2 м 2—4 тыс. т.т. при продолжительности анализа 20—80 мин. Недостатки физически нанесенных фаз стимулировали быстрое развитие методов химической прививки фаз, далее широко использовавшихся для других групп сорбентов.

Наряду с достоинствами поверхностно-пористых сорбентов (возможность упаковки в колонки сухим способом, легкость фракционирования, широкий ассортимент привитых и нанесенных фаз) обнаружились их серьезные недостатки. Главными следует считать малую емкость по пробе, связанную с малой поверхностью сорбента в колонке (основной объем сорбента занимает непористое ядро, не участвующее в разделении), большое гидравлическое сопротивление длинных колонок, их малую производительность и быструю перегрузку в препаративной работе, сложную технологию получения сорбентов и их высокую цену, недостаточную эффективность колонок и длительность анализа.

В настоящее время поверхностно-пористые сорбенты практически не используют для аналитической работы. Единственная область применения, которая для них сейчас осталась,— это использование в предколонках. Предколонки устанавливают перед аналитической колонкой для улавливания необратимо сорбируемых загрязнений из проб, особенно в медицине и биологии. Однако несмотря на легкость перезаполнения сухим способом таких предколонок, их малая емкость по примесям по сравнению с пористыми микрочастицами и, следовательно, необходимость частого перезаполнения с большой затратой времени и сорбента позволяют усомниться в целесообразности их использования и в этой области.

Дальнейшее быстрое развитие ВЭЖХ базировалось на новом поколении сорбентов: микрочастицах диаметром от 3 до 10 мкм, главным образом на основе силикагеля, частично— оксида алюминия, а в последнее время на основе пористых полимеров.

4.1 СИЛИКАГЕЛЬ, ЕГО СТРУКТУРА И ХИМИЯ ПОВЕРХНОСТИ

Силикагель представляет собой почти чистый диоксид кремния SiO_2 , однако технические его сорта содержат примеси. Силикагель всегда содержит большие, или меньшие количества адсорбированной воды (на этом основано его широкое использование в качестве осушителя). Кроме того, технический силикагель содержит другие оксиды, прежде всего оксид алюминия, также железа, который придает техническому силикагелю желтоватый или даже коричневый цвет. Силикагель имеет разную поверхность, составляющую обычно $100\text{--}600\text{ м}^2/\text{г}$, и значительный объем пор ($0,5\text{--}1,2\text{ мл/г}$) с преобладанием пор диаметром от 5 до 15 нм.

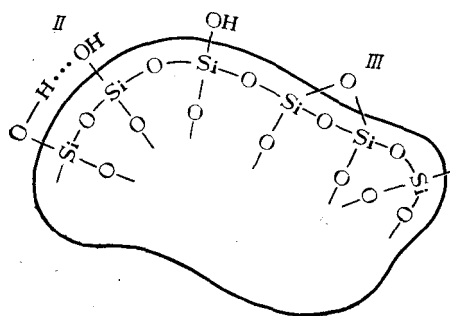
Силикагель получают разными способами, позволяющими варьировать его чистоту и другие свойства. Наиболее общим является метод получения силикагеля из так называемого жидкого стекла, представляющего собой натриевую соль поликремневой кислоты, путем его обработки кислотами с последующим высушиванием образующейся поликремневой кислоты, разлом получающегося кускового силикагеля и выделением жидкой фракции рассеиванием. Такой метод был исторически первым, использовавшимся для получения силикагеля, применяемого в колоночной (классической) и тонкослойной хроматографии. На базе такого же силикагеля были получены первые сорбенты специально для ВЭЖХ типа партисил (фирма «Ватман») и лихросорб (фирма «Мерк»). Получали их путем сепарирования на специально разработанных воздушных сепараторах силикагеля для ТСХ.

В дальнейшем были разработаны способы получения силикагелей специально для ВЭЖХ путем направленного формования в процессе синтеза силикагеля микросфер нужной фракции с преобладанием частиц размером $3\text{--}12\text{ мкм}$ (фирмы Дюпон», «Мерк», «Мэчери-Нэгель», «Фейз Сепарейшн», «Сепарейшенс Груп», «Шендон Саусерн» и др.) под торговыми марками соответственно зорбакс, лихросфер, нуклеосил, сферисорб, видак, хайперсил. Регулированием процессов формования микросферического силикагеля и его отверждения, сушки последующей химической обработки получается широкая гамма сорбентов для ВЭЖХ зернением 3, 5, 7 и 10 мкм с узким фракционным составом. Если процесс формования не позволяет получить сразу узкую фракцию микросфер, их подвергают воздушному сепарированию, так же как и размолотый кусковой силикагель.

В настоящее время разные фирмы производят более 200 сорбентов для ВЭЖХ на основе силикагеля как с неправильной формой частиц, так и в виде микросфер. Ассортимент их непрерывно расширяется за счет появления новых привитых фаз к известным силикагелям для ВЭЖХ или же новых вариантов прививки тех же фаз, появления новых силикагелевых матриц с более широкими порами или более узко сепарированных, появления новых фирм-производителей.

Вопрос о том, являются ли частицы сферической формы предпочтительными по сравнению с частицами неправильной формы и обеспечивают ли они получение каких-либо особых преимуществ, обсуждался многими авторами, однако никаких убедительных доказательств большей эффективности, стабильности, проницаемости более дорогих микросферических сорбентов представлено не было. Тем не менее следует отметить, что большая часть вновь появляющихся сорбентов имеет форму микросфер.

Рис. 4.1. Группы на поверхности силикагеля:



I - свободная силанольная; II - силанольная, связанная водородной связью;
III -силоксановая

Химия поверхности силикагеля для ВЭЖХ независимо от способа его получения примерно одна и та же. Поверхностный слой силикагеля, который в дальнейшем работает как адсорбент или же служит той матрицей, к которой прививают химически неподвижную фазу, можно представить себе следующим образом (рис. 4.1). На поверхности силикагеля, таким образом, можно обнаружить несколько видов групп, способных к взаимодействию с веществами в процессе последующего хроматографического анализа или в процессе прививки неподвижной фазы. Прежде всего, это может быть силанольная группа со свободным гидроксильным (тип I). Во-вторых, это может быть силанольная группа, свободный гидроксил которой образует с соседним атомом кислорода за счет его неподеленной пары электронов водородную связь (тип II), при этом образуется устойчивый шестичленный цикл. В-третьих, это может быть силоксановый мостик, который образуется за счет отщепления молекулы воды от двух силанольных групп (тип III). Последний тип связи может за счет обратимой реакции гидролиза превратиться в две силанольные группы (тип I).

Количество групп как силанольных, так и силоксановых на единицу массы силикагеля зависит от ряда факторов. Так, чем больше удельная поверхность силикагеля (она меняется в пределах от 1000 до 15 м²/г), тем больше групп обоих типов находится на сорбенте в колонке и, следовательно, сильнее удерживание взаимодействующих с ними веществ. Далее, в процессе получения силикагеля он подвергается сушке, от длительности и условий которой зависит соотношение силоксановых и силанольных групп. При сушке геля поликремневой кислоты — исходного продукта для силикагеля — сначала идет поликонденсация с выделением воды и образованием жесткого скелета силикагеля. При нагревании до 200°C вся физически сорбированная вода удаляется, а поверхность остается полностью гидроксильной, т. е. количество силанольных групп будет максимальным, а силоксановых — минимальным. Если продолжить нагревание, силанольные группы начнут отщеплять воду с образованием силоксановых групп; этот процесс заканчивается примерно при 1000°C. Дальнейшее нагревание приводит к спеканию частиц силикагеля с уменьшением как объема пор, так и размера частиц, а затем и к плавлению с образованием кварца.

Силанольные группы, располагающиеся на поверхности силикагеля, обладают слабокислыми свойствами и способны поэтому сильнее удерживать вещества с основными свойствами. Силоксановые группы могут в процессе работы за счет гидролиза переходить в силанольные, что меняет свойства поверхности сорбента и удерживание веществ.

4.2 ОКСИД АЛЮМИНИЯ

Оксид алюминия, применяемый в качестве сорбента как в газовой, так и в жидкостной хроматографии, получают путем дегидратации при высушивании гидроксида

алюминия (III). Зависимости от условий дегидратации получают ряд форм — модификаций кристаллической формы оксида алюминия, из которых для хроматографии используют гамма-оксид алюминия.

Применяемый для хроматографии оксид алюминия отвечает формула, в которой на две молекулы оксида приходится молекула воды. Его поверхность и структура похожи на силикагелевые, однако не идентичны и обеспечивают в ряде случаев селективность, отличающуюся от селективности силикагеля. Поверхностные гидроксилы оксида алюминия более прочны и полностью удаляются даже при 1000 °С. Обратная гидратация поверхности при комнатной температуре протекает медленно. Ионы алюминия в отличие от ионов кремния способны взаимодействовать с многими молекулами разделяемых веществ вплоть до необратимой сорбции некоторых молекул) и дают ей вклад в удерживание.

Хотя оксид алюминия широко и давно используют в колонной и тонкослойной хроматографии, его применение в ВЭЖХ имеет ограниченный характер. Это связано с тем, что микрочастицы оксида алюминия выпускают не все фирмы-производители сорбентов, а привитые фазы на этой основе не выпускаются совсем. Тем не менее в некоторых случаях, когда требуется селективность, отличная от селективности силикагеля, оксид алюминия применяют. Его также используют и в тех случаях, когда нужно перейти к ВЭЖХ от методики ТСХ, размотанной на пластинках с оксидом алюминия.

4.3. ПРИВИТЫЕ СОРБЕНТЫ НА ОСНОВЕ СИЛИКАГЕЛЯ ДЛЯ НОРМАЛЬНО-ФАЗНОЙ И ОБРАЩЕННО-ФАЗНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Сорбенты с химически привитыми фазами на основе силикагеля появились позже сорбентов, на которые неподвижная фаза (в виде индивидуальных веществ или, чаще, полимеров различной структуры и полярности) наносилась физически, т.е. аналогично тому, как фазу наносили и продолжают наносить в газожидкостной хроматографии. Нанесенная фаза довольно быстро смывается растворителем (гораздо быстрее, чем она испаряется или изменяется в газожидкостной хроматографии), параметры удерживания постоянно меняются, препаративно собираемые фракции загрязняются фазой. Использование растворителя, насыщенного неподвижной фазой, позволило несколько повысить стабильность таких сорбентов и колонок, однако большинство недостатков при этом осталось.

Эти проблемы можно решить, если химически привить органическую неподвижную фазу к силикагелевой матрице. Силанольные группы, находящиеся в большом количестве на поверхности силикагеля (особенно полностью гидроксильированного), обладают слабокислыми свойствами и довольно легко вступают в многочисленные реакции. Первые из полученных таким путем привитофазных сорбентов, названных «щеточные» (привитые молекулы, как щетина в щетке, покрывали поверхность силикагеля), изготавливали этерификацией силанолов спиртами с образованием простой эфирной связи. Однако обратимость реакции, особенно в кислой и щелочной средах и в присутствии водных подвижных фаз, в большой мере ограничивала как срок работы таких сорбентов, так и области их применения.

Позднее были разработаны методы получения привитых фаз разного типа с использованием гораздо более прочных и устойчивых к гидролизу связей Si—O—Si и Sj—C. Практически все имеющиеся в продаже привитофазные сорбенты относятся к этому типу, их более 200. Привить химически фазу к силикагелю может любой высококвалифицированный химик-органик по имеющимся прописям. Однако приготовить сорбент, воспроизводимый от партии к партии, чрезвычайно трудно, это не всегда удается даже обладающим как патентами, так и «ноу-хау» лабораториям и производствам фирм-изготовителей. Еще более проблематичной является попытка воспроизвести в лаборатории какой-то фирменный сорбент по имеющимся литературным и патентным

данным; множество нюансов в подготовке исходного силикагеля, растворителей и реагентов, проведении реакции, удалении непрореагировавших реагентов и побочных продуктов сводят шансы на удачу почти к нулю. Точно так же проблематичным является использование при воспроизведении описанных в литературе разделений «аналогов» сорбентов других форм, что в первую очередь относится к сложным разделениям и использованию обращенно-фазных сорбентов. Сказать «использовался обращенно-фазный сорбент, представляющий собой октадецилсилан, привитый к силикагелю»,— значит не сказать почти ничего, если не указана фирма-производитель. Многочисленные описанные в литературе случаи инверсии порядка выхода пиков смесей на разных сорбентах «С18 на силикагеле» и других или даже полной адсорбции ряда веществ на другом сорбенте подтверждают этот факт.

Тем не менее привито-фазные сорбенты сейчас наиболее популярны, несмотря на их высокую стоимость и отмеченные недостатки. Более 60% разделений методом ВЭЖХ (по другим данным—более 70%) выполняют с использованием только обращенно-фазных привитых сорбентов, основным из которых является сорбент с привитой фазой С₁₈.

Можно отметить следующие преимущества, обеспечивающие преобладающее использование привитых сорбентов на основе силикагеля: механическая устойчивость к высоким давлениям; отсутствие перехода привитой фазы в растворитель в процессе хроматографического разделения (если не протекают реакции, приводящие к химическому отщеплению привитой фазы); устойчивость к действию растворителей, температуры, воды, pH; быстрота установления равновесия при смене элюента, что обеспечивает оперативность работы и возможность работы в градиентном режиме с быстрым возвратом к исходному режиму; возможность варьировать в широких пределах селективность за счет изменения степени прививки, дополнительной химической обработки и замены растворителя.

Так как среди начинающих работать в области ВЭЖХ очень большой процент составляют специалисты по ГХ, имеет смысл сделать следующее замечание. Очень большой ассортимент неподвижных фаз (неоправданно большой, по мнению многих компетентных ученых) в ГХ и стремление иметь как можно более широкий выбор фаз и в ВЭЖХ—основная ошибка начинающих. Если в газовой хроматографии, по крайней мере в ее классическом варианте, подвижная фаза практически не оказывает влияния на селективность разделения, то в жидкостной хроматографии ее влияние огромно. Так как в разделении очень активно участвуют как привитая фаза, так и адсорбированные (абсорбированные) компоненты подвижной фазы, широкий ассортимент сорбентов для ВЭЖХ в большинстве случаев не нужен. Изменением состава подвижной фазы очень часто легко добиться той же селективности, что и за счет применения нового дорогостоящего привито-фазного сорбента. Приведенное выше утверждение не относится, конечно, к принципиально новым вариантам сорбентов для ВЭЖХ (например, особо широкопористым, предназначенным для работы с большими молекулами, такими, как белки). Для начинающего же работать в ВЭЖХ рекомендуется тщательно изучить 2-4 сорбента, находящие применение для его объектов исследования, и широкий ассортимент растворителей и добавок разного типа, их влияние на разделение данного класса веществ на выбранной группе сорбентов. Только после того, как приобретен опыт работы с привитыми фазами в комплексе с растворителями, но есть задачи, которые не удастся решить с их помощью, следует пробовать новые привитые фазы. Справедливость данного замечания как раз и подтверждается тем, что 60—70% успешных разделений, описанных в литературе, проведено только на привитых фазах одного типа — обращенно-фазных, к рассмотрению которых мы сейчас и перейдем.

Наиболее популярными являются так называемые обращенные привитые фазы, применяемые в обращенно-фазной ВЭЖХ. Понятие «обращенный» пришло от классической ЖХ на силикагеле, где в «прямой» системе подвижная фаза неполярна, а неподвижная полярна (соответственно гексан и силикагель). По этому принципу «обращенная» система должна иметь полярную подвижную фазу и неполярную неподвижную (соответственно водный метанол и октадецилсилан на силикагеле, привитый

химически). Названия обращенно-фазный сорбент и обращенно-фазная система не являются особенно удачными или понятными, однако так как это название общепринято, то мы будем его придерживаться.

Поверхность силикагеля, как известно,—довольно большая и развитая (обычно 100—600 м²/г), и в случае гидроксированного силикагеля покрыта в основном силанольными группами, имеющими концентрацию около 5 на 1 нм² поверхности. Расчетная максимальная плотность силанольных групп на поверхности несколько выше и составляет около 8 на 1 нм². Полное гидроксирование поверхности силикагеля достигается путем его обработки водой при кипении в течение нескольких часов.

Для получения обращенно-фазного сорбента гидроксированный силикагель обычно обрабатывают хлорсиланами, которые вступают в реакцию довольно активно и образуют при этом устойчивые к гидролизу связи —Si—O—Si—C—. Несмотря на кажущуюся простоту процесса, оказалось, что имеются многочисленные сложности. Первоначально считали, что все силанольные группы вступят в реакцию с образованием мономолекулярного слоя привитой фазы. На практике оказалось, что не все силанольные группы, а только 1,5—2,2 на 1 нм² вступят в реакцию с алкилхлорсиланами, а остальные не могут реагировать вследствие стерических препятствий и остаются на поверхности сорбента. Правда, привитые группы стерически затрудняют подход к ним молекул анализируемых веществ в процессе разделения.

Первоначально использовали для прививки промышленно доступные три- и дихлорсиланы (октадецилтрихлорсилан и др.), которые, будучи ди- и трифункциональными, способны вступать друг с другом в реакцию полимеризации до того, как вступят в реакцию с силанольными группами. Эта полимеризация приводит к тому, что на поверхности могут образоваться значительно более толстые, чем мономолекулярные, полимерные слои фазы (более или менее сильно привитые к поверхности силикагелевой матрицы). В этом случае содержание привитого углерода, определяемое сжиганием, окажется выше, чем теоретически должно привиться по схеме монослойного покрытия поверхности силикагеля. При этом, несмотря на сильное удерживание пробы из-за высокого содержания привитой фазы, эффективность разделения за счет затрудненной диффузии в толстых полимерных пленках может заметно упасть. В то же время большие участки поверхности силикагеля окажутся не покрытыми фазой, что приведет к сильному взаимодействию анализируемых веществ с незкранированными силанольными группами.

Старые, давно разработанные обращенно-фазные сорбенты, как правило, получали обработкой силикагеля октадецил- или октилтрихлорсиланами. При этом покрытие поверхности было неполным, а привитые слои в той или иной степени (в зависимости от содержания воды в растворителе, степени безводности силикагеля, герметичности аппаратуры, технологии и т.д.) были полимеризованы.

Работа по улучшению качества привитого слоя велась разными учеными постоянно и в разных направлениях. С целью устранения полимеризации прививаемого агента было предложено использовать монохлорсиланы (например, диметил-октадецилхлорсилан, диметил-октилхлорсилан и др.), которые по природе своей монофункциональны и могут дать только мономерный привитый слой. Вода дезактивирует монохлорсиланы, вступая с ними в реакцию, однако в реакцию прививки они уже не вступают и после окончания реакции отмываются вместе непрореагировавшим исходным алкилдиметилхлорсиланом. С целью устранения влияния остаточных силанольных групп было предложено после проведения прививки вести так называемое «окончательное замещение», или «энд кэппинг». В этом случае после прививки основной фазы сорбент обрабатывают сильными реагентами с минимальным мольным объемом (на пример, триметилхлорсиланом), которые блокируют основную массу непрореагировавших силанольных групп. С целью получения сорбентов с более воспроизводимыми хроматографическими свойствами значительно больше внимания стало уделяться качеству растворителей и прививаемых силанов, подготовке (гидроксированию) исходного силикагеля.

По мере разработки усовершенствованных методов прививки обращенных фаз практически все фирмы имели возможность использовать их для производства нового поколения сорбентов. Тем не менее не было прекращено производство старых сорбентов. В чем причина этого? Причин несколько, но основными являются две: наличие - налаженного производства сорбентов по старой технологии и нежелание его прекращать или перестраивать; разработанные методы анализа разных смесей и требования потребителей, не желающих менять свои методики анализа. Более консервативные фирмы, имеющие хороший сбыт старых обращенно-фазных сорбентов, продолжают их выпускать, а более прогрессивные наряду с выпуском старых организуют выпуск новых модификаций сорбентов, вводя для них отличительные знаки или цифры. Так, фирма «Ватман» имеет четыре варианта сорбента «октадецилсилан на силикагеле», при этом силикагелевая матрица одна и та же, фирма «Уотерс» — не менее трех, различающихся методом прививки и силикагелевыми матрицами (два сферической формы и один — неправильной), фирма «Фэйс Сепарейшн» — два варианта на одной силикагелевой матрице и т.д.

Ознакомившись с этими данными, начинающий и даже более опытный специалист по ВЭЖХ обычно задает вопрос: какой же обращенно-фазный сорбент следует считать наилучшим и приближающимся к идеальному? Ответить на такой вопрос конкретным названием сорбента, к сожалению, невозможно по многим причинам. Основной из них является то, что наилучшим, с точки зрения хроматографии, является тот сорбент, который обеспечивает для данной смеси наилучшее разделение в кратчайший срок. Зачастую сниженная химическая однородность поверхности старых сорбентов в результате комбинированного (распределительного и адсорбционного, иногда в сочетании с ионообменным) механизма удерживания обеспечивает такое разделение, а сорбент с химически более однородной поверхностью не обеспечивает.

Однако, если поставить вопрос в другой форме, а именно: какой сорбент теоретически является идеальным для обращенно-фазной хроматографии и каким требованиям должен отвечать соответствующий реальный сорбент — ответить можно более конкретно. Идеальным для обращенно-фазной хроматографии следует считать сорбент, обеспечивающий «чисто обращенно-фазное» взаимодействие растворенного вещества с его поверхностью, т.е. при полном отсутствии влияния адсорбции, взаимодействия с полярными группами, ионообменных и эксклюзионных процессов. Исходя из этого, приближающийся к идеальному реальный сорбент должен иметь максимально полное покрытие поверхности мономолекулярным слоем привитой фазы, в нем должны отсутствовать доступные для взаимодействия с анализируемыми веществами силанольные и другие полярные группы или группы с ионообменными свойствами, он должен иметь минимальное количество таких групп, которые экранированы и недоступны для подобных взаимодействий (теоретически), и иметь поры, практически исключаящие вклад в удерживание анализируемых веществ эксклюзионных процессов. Такой сорбент должен, по имеющимся представлениям, иметь поры размером 10—30 нм (для анализа веществ с молекулярной массой до 800—1000). Перед прививкой поверхность сорбента должна быть полностью гидроксिलирована, однако сорбент не должен содержать адсорбированной воды. Прививку следует проводить с использованием монохлорсиланов, например октадецилдиметилхлорсилана, в условиях, обеспечивающих наиболее полное протекание реакции с силанольными группами. После окончания прививки проводят «энд кеппинг», т.е. обработку триметилхлорсиланом для окончательного устранения доступных силанольных групп на поверхности сорбента. Наконец, сорбент должен быть полностью отмыт после окончания реакции от всех остатков использовавшихся реактивов и побочных продуктов реакции.

Каждому хроматографисту приходится решать, какой же из доступных для него обращенно-фазных сорбентов является наиболее приближающимся к идеальному. При этом ему приходится пользоваться данными фирмы о размере пор (среднем) U их кривой распределения, об объеме пор, поверхности сорбента, прививаемом агенте, наличии или отсутствии дополнительной обработки («энд кэппинга»). Эти данные, как правило,

неполные и не содержат многих важных сведений, касающихся технологии и в большой мере определяющих качество сорбента. Кроме того, многие данные носят рекламный характер.

Силикагель, используемый как матрица для последующей прививки неподвижной фазы, играет важнейшую роль в определении конечных свойств получаемого сорбента. Он имеет пространственно-пористую структуру, образованную диоксидом кремния в процессе образования золя, геля и последующей его сушки с удалением физически сорбированной воды. В зависимости от условий формования силикагеля могут быть получены образцы со средними размерами пор от 3 до 10 нм. За счет последующей гидротермальной обработки силикагеля может быть достигнуто значительное увеличение размера пор (до 20—50 нм и более) при сохранении в основном объема пор. Методами формования микросферических сорбентов для ВЭЖХ из тетраэтоксисилана за счет варьирования условий формования и отверждения, выбора растворителей и т.п. удается добиться получения силикагеля с достаточно высокой пористостью (свободный объем пор 0,7—1,2 мл/л) и порами от 5 до 400 нм и более.

Какую же силикагелевую матрицу использовать для прививки неподвижной фазы? Следует учитывать ряд важных обстоятельств. Если использовать матрицу с порами 3—5 нм, размер таких пор соизмерим с длиной цепи октадецилсилана (около 1 нм). Если предположить плотную прививку к такому сорбенту октадецилсилановых групп, становится очевидным, что узкие поры уменьшатся в диаметре очень значительно (некоторые даже вообще закроются) и станут недоступными для попадания в них крупных анализируемых молекул. Это может внести существенный вклад в изменение удерживания и порядка выхода компонентов. Если первоначально для прививки использовали силикагели с размерами пор 5—6 нм, то в последующем перешли к порам около 10 нм, а сейчас считают более целесообразным даже 15—30 нм. Это связано со все возрастающим использованием привитых сорбентов для анализа р больших по молекулярной массе биополимеров, таких, как белки, полипептиды и др.

Кроме размера пор, большую роль играет объем пор силикагеля и его поверхность. Если рост поверхности дает увеличение количества силанольных групп (их плотность около 5 на 1 нм²) и количества привитой фазы при равной плотности прививки, то рост объема пор играет сложную роль. При увеличении объема пор не только увеличивается проницаемость силикагеля, но и уменьшается объем самого диоксида кремния и соответственно прочность силикагеля; он легче разрушается в процессе транспортировки, при набивке колонок, повышении давления при эксплуатации колонок. Правда, прочность определяется не только толщиной стенок ячеек силикагеля, но и их структурой.

Относительно распределения пор силикагеля по размеру можно сказать, что есть образцы как с более узким, так и с более широким распределением. Кажется желательным иметь более узкий диапазон распределения пор по размерам, так как в этом случае однородность пор приводит к большей однородности прививки, ситовых эффектов и др.

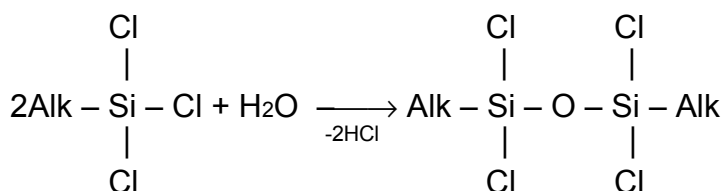
Для качественной прививки фазы к силикагелю важна подготовка его поверхности перед прививкой. Поверхность должна быть полностью гидроксильирована и не содержать сорбированной воды. Если гидроксильирование поверхности проведено не полностью (например, силикагель пересушен выше 180—200 °С) это приводит к тому, что образовавшиеся силоксановые группы не вступают в реакцию прививки, и количество привитой фазы уменьшается. С другой стороны, при последующем использовании такого сорбента его свойства в процессе эксплуатации в водных средах будут меняться, так как возможен гидролиз силоксановых групп с образованием новых активных силанольных групп.

Гидроксильирование проводят кипячением силикагеля в воде в присутствии кислот в течение нескольких часов и затем сушат при температуре до 150 °С. Сушка должна обеспечить удаление физически сорбированной воды, так как она приводит к бесполезному расходу прививаемого хлорсилана, загрязнению сорбента побочными продуктами реакции и изменению выбранного мольного соотношения хлорсилана и силанольных групп.

Следует ли предпочесть сферические частицы матрицы частицам неправильной формы? Однозначного ответа нет. Но большинство исследователей предпочитают частицы правильной сферической формы, которые должны давать более плотно и равномерно упакованный слой сорбента, снижать сопротивление потоку, меньше разрушаться в процессе набивки и работы колонок и т. п.. Пока никто еще убедительно не продемонстрировал заметных преимуществ сферических частиц; однако следует отметить, что большинство вновь появляющихся сорбентов являются сферическими микрочастицами.

Остановимся теперь на выборе прививаемого агента. Если вначале были испробованы многие классы прививаемых агентов, то в настоящее время практически остался один тип — хлор- или алкоксипроизводные алкилсиланов, дающие в процессе прививки довольно стойкую к гидролизу или расщепленную связь Si—O—Si—C. Метод прививки с образованием еще более прочной связи Si—C, заключающийся в замене в силанольных группах силикагеля гидроксильной группы на галоген (хлорирование силикагеля) и последующем взаимодействии галогена, например с бензиллитием используется только в исследовательской работе и мало пригоден для промышленного производства из-за взрывоопасности и нетехнологичности.

Алкилхлорсиланы, наиболее дешевые и доступные из прививаемых агентов, могут быть трех типов: алкилтрихлорсиланы, диалкилдихлорсиланы и триалкилхлорсиланы (вместо алкила может быть и арил). Из этих трех наиболее дешевый и доступный продукт — алкилтрихлорсиланы, которые и использовались практически во всех ранних работах и в производстве первых привито-фаэзных сорбентов, появившихся на рынке. Однако для получения мономерного привитого слоя с применением этих силанов, имеющих три реакционноспособные группы, требуется очень высокий технический уровень работы, который относительно легко достигается в лаборатории, но трудно достижим на производстве. Если трихлорсиланы вступают в контакт с любым содержащим следы воды веществом (недосушенным силикагелем, воздухом, растворителем и др.), они немедленно отнимают воду, вступая в следующие реакции:



и т.д.

Образующиеся при этом димеры, тримеры и продукты с еще большей степенью полимеризации реагируют с силанольными группами силикагеля, давая вместо мономерного привитой полимерный слой фазы. Этот полимерный слой, естественно, является неравномерным и большим по толщине, чем мономерный. Диффузия анализируемых молекул в таких более толстых пленках замедлена, и как правило, эффективность колонок с такими сорбентами более низкая. Другим недостатком является то, что те атомы хлора в молекуле, которые не прореагировали с силанольными группами из-за пространственных затруднений, могут в дальнейшем гидролизироваться в процессе работы вводными растворителями с образованием полярных силанольных групп. Последние могут взаимодействовать с анализируемыми веществами, имеющими полярные группы, изменяя времена удерживания.

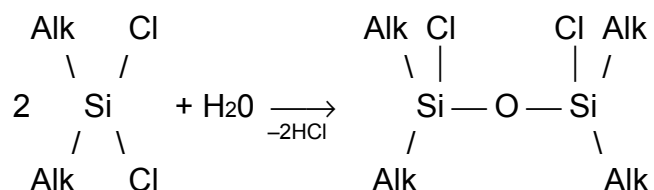
Однако полимерные слои, особенно имеющие небольшую толщину и получаемые при малой степени полимеризации трихлорсиланов до и в процессе прививки, имеют и некоторые преимущества перед мономерным привитым слоем. В частности, если толщина слоя небольшая, то скорость диффузии анализируемых молекул уменьшается незначительно; в то же время такая полимерная молекула соединена с силикагелевой

матрицей не одной, как мономерная, а многими связями. Поэтому разрыв одной связи, например, в результате гидролиза, приводит к отрыву и переходу в подвижную фазу мономерной молекулы, тогда как полимерная удерживается на месте другими связями и продолжает участвовать в разделении до разрыва всех удерживающих ее связей. Это важно, если по условиям анализа требуется использовать растворитель с $\text{pH} < 3$ или > 8 , что ускоряет протекание гидролиза и отщепления привитой фазы.

Как видно из приведенной схемы димеризации алкилтрихлорсилана, если исходная молекула имеет три реакционно-способных хлора, то димер — четыре, соответственно тример будет иметь их 5, тетрамер — 6 и т.д. В этом случае, как мы видим, с увеличением молекулярной массы полимера число потенциальных центров прививки молекулы к силикагелю растет. Однако и пространственные затруднения при взаимодействии такой молекулы с силикагелевой матрицей также возрастают по мере роста ее молекулярной массы, поэтому по мере достижения некоторой молекулярной массы количество реально образующихся связей прививаемой фазы и силикагелевой матрицы доходит до максимума, а в дальнейшем начинает снижаться.

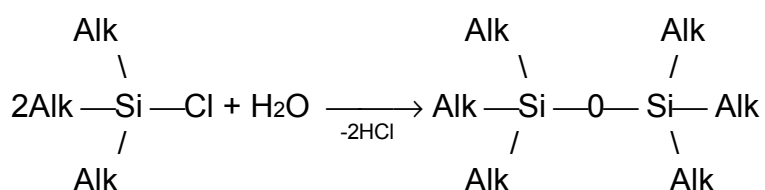
По приведенным выше схемам прививают такие распространенные агенты, как октилтрихлорсилан, октадецилтрихлорсилан и др.

По несколько другой схеме полимеризация осуществляется, если прививаемый агент — диалкилдихлорсилан (или алкиларилдихлорсилан, или диарилдихлорсилан). Реакция при его взаимодействии с водой следующая:



Образующиеся при этой реакции димеры, тримеры и полимеры также могут реагировать с силанольными группами силикагеля, давая вместо привитого мономерного привитой полимерный слой фазы. Однако этот полимер отличается от того, который образуется при реакции с силикагелевой матрицей алкилтрихлорсиланов. Первое отличие состоит в том, что он получается линейным по цепи — $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-\text{O}-$, поскольку исходный диалкилдихлорсилан и его димер, тример, тетрамер и т.д. являются бифункциональными и содержат по два активных атома хлора. Во-вторых, если прививка такого полимера к силикагелевой матрице происходит, она идет только в одной или в двух точках, т. е. отрыв при гидролизе такой привитой молекулы протекает более легко (достаточно разорваться одной или двум связям, и молекула полимера отрывается от матрицы и переходит в подвижную фазу). По указанной схеме прививают диметилдихлорсилан, дифенилдихлорсилан и др.

Наконец, если прививаемый агент является триалкилмонохлороиланом, он тоже может реагировать с водой, присутствующей в реакционной среде. Однако его реакционная способность значительно ниже, чем у ди- и трихлорсиланов. Кроме того, при этом образуется только димер по следующей схеме:



Так как димер не имеет реакционноспособных атомов хлора то он не вступает ни в реакцию дальнейшей полимеризации, ни в реакцию прививки к силикагелевой матрице. Это очень важно, ибо в этом случае при прививке гарантировано только мономерный привитой слой неподвижной фазы. Образовавшийся димер в дальнейшем удаляется при отмывке непрореагировавшего реагента и побочных продуктов реакции. Последний способ прививки, как видно из обсуждения, дает наиболее упорядоченный по структуре и составу привитый слой. Поэтому хотя стоимость таких исходных реагентов несколько выше, а реакционная способность их ниже, что забавляет вести прививку в более жестких условиях и брать избыток прививаемого реагента, популярность таких сорбентов растет, и большая часть вновь появляющихся сорбентов, как отмечено в рекламных данных, получена с использованием этого метода прививки. По такой схеме прививают октилдиметилхлорсилан, октадецилдиметилхлорсилан, триметилхлорсилан и др.

Какие же алкильные группы можно химически привить указанными способами к поверхности силикагеля? Наиболее применимы длинные алкильные цепи, обычно C₈ и C₁₈, но в последнее время растет популярность привитых более коротких алкилов C₄ и C₃, особенно на силикагелях с широкими порами для анализа биологически важных больших молекул. Чаще всего применяют привитой октадецилсилан. Он наиболее сильно удерживает анализируемые вещества и позволяет работать с элюентами, содержащими мало воды. Это целесообразно, так как анализируемые вещества, как правило, лучше растворяются в метаноле или ацетонитриле, чем в воде. Кроме того, аномально высокая вязкость смесей метанола и воды существенно снижается при большом содержании метанола, что позволяет работать при сравнительно низком давлении на колонке с большой эффективностью за счет повышения скорости диффузии при снижении вязкости.

Арильные (ароматические) привитые группы получают аналогичным способом, однако их используют реже. Они позволяют получить селективность, отличающуюся от селективности на привитых алкильных группах.

По мере роста длины цепи прививаемой молекулы ее реакционная способность уменьшается за счет пространственных затруднений при взаимодействии с силанольными группами силикагеля. Если из 5 силанольных групп, приходящихся на 1 нм² поверхности силикагеля, почти все удается заместить при прививке алкила C₁, то при алкиле C₁₈ в лучшем случае удастся заместить половину из них. Оставшиеся на поверхности не вступившие в реакцию силанольные группы экранируются уже привитыми молекулами и не могут вступить в реакцию с новыми молекулами октадецилхлорсилана. Однако для молекул с меньшей молекулярной массой, будь то молекулы растворителя или анализируемых веществ, пространственная затрудненность может оказаться недостаточно большой, чтобы воспрепятствовать их взаимодействию. Это может существенно изменить вид хроматограммы, которая покажет аномально большое удерживание (иногда с заметным уширением пика) для таких анализируемых молекул.

Для того чтобы более полно устранить силанольные группы на поверхности, которые остались после прививки октадецилхлорсилана, проводят окончательное закрытие («энд кэппинг») их путем обработки силилирующими агентами, имеющими малый размер молекул, обычно триметилхлорсиланом. Такие малые молекулы легко вступают в реакцию с частично экранированными силанольными группами. Аналогичную реакцию окончательного блокирования силанольных групп на поверхности силикагеля часто используют в тех случаях, когда прививку фазы проводят полимеризующимися три- и дихлорсиланами. Устранение силанольных групп с поверхности и их замена на триметилсиланольные гидрофобные группы повышает также устойчивость силикагельной матрицы к воздействию воды, особенно при рН менее 3 и более 8.

Условия проведения «энд кэппинга», в том числе предварительная подготовка и обработка поверхности с целью перевода оставшихся непрореагировавших атомов хлора в гидроксильные или другие реакционноспособные группы, выбор растворителей, катализаторов, условий реакции, как правило, составляют «ноу хау» фирмы. Часто проведение «энд кэппинга» практически не меняет таких характеристик сорбента, как содержание углерода, удельная поверхность и др., однако характер взаимодействия с

поверхностью такого сорбента для молекул, имеющих полярные группы, особенно обладающие кислотными или основными свойствами, изменяется очень резко.

Наряду с алкильными и арильными группами таким же путем, используя замещенные моно-, ди- и трихлорсиланы, можно к силикагелевой матрице привить и другие группы, наиболее распространенными из которых (в порядке уменьшения частоты применения) являются следующие: $-\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{CN}$ —алкилнитрильная группа; $-\text{Si}-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ —алкиламинная группа (возможна вторичная или третичная аминогруппа), слабый анионообменник; $-\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2\text{OH}$ —алкилдиолильная группа; $-\text{Si}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_3\text{H}$ —сильный катионообменник, содержащий сульфогруппу (или сульфогруппы); $-\text{Si}-[\text{Alk}_4\text{N}]^+\text{OH}^-$ —сильный анионообменник, содержащий четвертичную аммониевую группу.

Если алкилнитрильную и алкиламинную группы прививают, как правило, за один прием, то прививка других групп более сложна и включает ряд последовательных реакций (две или три). Такие сорбенты, естественно, более сложны в производстве, и воспроизводимость их характеристик ниже, тогда как стоимость значительно выше.

Алкилнитрильную, алкиламинную и алкилдиолильную привитые фазы можно использовать в разных вариантах хроматографии. Прежде всего они могут быть применены для работы с неполярными растворителями типа гексан — изопропанол, где они проявляют свойства, близкие к свойствам силикагеля без привитой фазы. Однако их селективность отличается от селективности силикагеля, что позволяет подобрать наилучший сорбент для каждого анализа. Кроме того, их преимуществом перед силикагелем является более быстрое уравнивание с растворителем, и это позволяет использовать их при работе с изменением состава растворителя в процессе анализа, т. е. с градиентом растворителя. Они также менее чувствительны к влиянию воды.

Алкилнитрильную фазу используют и в обращенно-фазной хроматографии, селективность при этом получается иная, чем на силикагелях с алкильной группой. Такой же эффект наблюдается при применении алкиламинной группы. Кроме того, она проявляет слабые анионообменные свойства, что часто используют при анализе биологически активных веществ, например олигонуклеотидов с градиентами по pH и силе буферного раствора. Алкилдиолильную группу, кроме нормально-фазной хроматографии, применяют как фазу, позволяющую работать с белками в режиме эксклюзионной хроматографии, которая не сорбирует необратимо и не денатурирует их, сохраняя биологическую активность белков.

Сильные катионо- и анионообменники находят применение анализе биологических жидкостей для определения ряда лекарственных препаратов, биогенных аминов, их метаболитов и др. Разработан метод ион-парной хроматографии, в котором используют динамические слои катионо- или анионоактивных агентов, обладающие свойствами ионообменников и в то же время обращенно-фазных сорбентов. Эти слои наносят из растворителя, содержащего ион-парный реагент, (обычно алкил-сульфоислоты или тетраалкиламмониевые основания), пропуская его через сорбент для обращенно-фазной хроматографии. Ион-парная обращенно-фазная хроматография является методом анализа смеси ионизирующихся и неионизирующихся веществ.

Многие производители сорбентов не выпускают полного ассортимента сорбентов всех описанных выше типов, поскольку ограниченный спрос на такие сорбенты не окупает затрат на их разработку и производство. Есть фирмы, выпускающие не только все перечисленные сорбенты, но и дополнительно ряд других с привитыми нитрогруппами, карбокси- и карбоксиметильными группами, оптически активными фазами и т.д. Практически все фирмы выпускают основной ассортимент привитых фаз, который включает C_8 , C_{18} , нитрильную и аминофазы, различающиеся также по зернению.

Несмотря на большую и все возрастающую популярность сорбентов с привитыми фазами, до сих пор вопрос о механизмах разделения на них остается не совсем ясным и часто поднимается в дискуссиях, где высказываются различные, нередко противоположные мнения о их роли в процессах разделения. Если на разделение и удер-

живание влияет несколько механизмов, то вклад каждого определяется несколькими факторами; основными являются свойства поверхности сорбентов, состав элюента и химическая природа каждого из анализируемых веществ.

Рассмотрим концепции о действии механизмов разделения, например в случае обращенно-фазных сорбентов, получивших наибольшее распространение.

Первоначальное представление о работе обращенно-фазных сорбентов было высказано, когда перешли от нанесенных на силикагель полимерных жидких фаз (жидкостно-жидкостная хроматография) к октадецилтрихлорсилану и его аналогам, химически привитым на поверхность силикагеля в пелликулярных материалах, дававшим привитую довольно толстую полимерную пленку фазы. Поэтому первый подход к привитой фазе был как к пленке жидкости на носителе, разделение на которой происходит за счет разных коэффициентов распределения анализируемых веществ между двумя жидкостями — растворителем и привитой фазой, т. е. за счет абсорбции. Такой подход получил признание, как позволивший получить и предсказать линейную зависимость удерживания неполярных гомологов, таких, как алкилбензолы. Этот же подход был распространен в дальнейшем и на привитые монослои алкилсиланов, хотя здесь он представляется более удаленным от действительности, поскольку жидкости как таковой на поверхности нет, а есть только отдельные привитые химически молекулы, «раствориться» в которых молекула анализируемого вещества не может. В этом случае может идти речь о взаимодействии молекул привитой фазы и анализируемого вещества за счет межмолекулярных сил.

Первоначальное представление о механизме разделения на раценных фазах оказалось верным, однако для веществ более сложного строения с функциональными группами отклонения были частыми и большими. Развитием этой концепции было предположение о том, что на поверхности обращенно-фазного сорбента из растворителя, который содержит подобий привитому слою компонент (метанол или ацетонитрил), и менее ему подобный (вода), образуется удерживаемый силами адсорбции слой жидкой фазы, обогащенный менее полярными компонентами (метанолом). Этот слой имеет другой состав, чем подвижная фаза, и заметно отличается от привитой фазы по своей природе. Поэтому, участвуя в разделении анализируемых веществ, такой слой сильно взаимодействует с полярными группами веществ по другому механизму, чем привитой слой.

Для более полного представления о сложности механизмов разделения следует учесть, что силанольные группы, пространственно недоступные при прививке неподвижной фазы из-за большого объема триметилсилил-, диметилдоктадецилсилил- или диметилдоктилсилильных групп, остаются на поверхности сорбента в большом количестве (около половины от имевшихся на поверхности исходного силикагеля). Они являются пространственно доступными для малообъемных небольших молекул, таких, как молекулы воды, метанола, ацетонитрила, которые способны взаимодействовать с ними, давая поляризованные слои растворителей также другого состава и свойств, чем использованный растворитель. Эти поляризованные молекулы также взаимодействуют с молекулами анализируемых веществ и дают свой вклад в удерживание. Наконец, силанольные группы имеют слабокислотную функцию и могут участвовать в разделении, действуя как ионообменники, взаимодействуя не только с анализируемыми веществами, но и извлекая ионы металлов переменной валентности, такие как железо, хром, никель и другие присутствовавшие в растворителе, пробе или образующиеся в результате коррозионных процессов в аппаратуре. Показано, что на поверхности сорбента, находящегося в аналитической бращенно-фазной колонке размером 4,6 X 250 мм, может сорбироваться более десяти микрограммов железа. Ионы металлов переменной валентности также участвуют в разделении, взаимодействуя с некоторыми из анализируемых веществ. Вклад в разделение вносят и эксклюзионные процессы, по-разному действующие на молекулы малой и большой молекулярной массы.

Таким образом, оценить по параметрам удерживания вклад каждого из механизмов разделения и сформулировать гипотезу возможно применительно к молекулам

родственного строения; для достаточно сложных молекул или смесей, очевидно, еще долго это не будет возможным даже при использовании мощного математического аппарата. Выбор оптимальных условий разделения с учетом возможных механизмов взаимодействия сорбента и анализируемых компонентов смесей еще долго будет оставаться основной проблемой при разработке аналитических методик в ВЭЖХ.

4.4. ПОЛИМЕРНЫЕ СОРБЕНТЫ ДЛЯ РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Ограниченный рабочий диапазон pH и сорбционная активность остаточных силанольных групп сорбентов на основе силикагеля стимулировали разработку полимерных сорбентов для распределительной хроматографии, в которой устранены указанные недостатки.

Первый сорбент этого типа, названный PRP-1 {*Polymer Reversed Phase*}, разработан фирмой «Гамильтон». Он представляет собой жесткий стирол-дивинилбензолный гель с удельной поверхностью 415 м²/г, объемом пор 0,79 см³/г и средним диаметром пор 7,5 нм, который выдерживает давление до 28 МПа. Более 98% его сферических частиц имеют диаметр 10 мкм, что обеспечивает высокую эффективность (40 000 т. т./м) и низкое сопротивление колонок. Фирма выпускает также готовые колонки с PRP-1 длиной 150 и 250 мм с внутренним диаметром 4,1 мм.

Еще большую эффективность имеет сорбент PRP-1 с размером зерен около 5 мкм, который выпускают с 1984 г. набитым в колонки размером 150X4,1 мм. По селективности данный материал подобен обращенно-фазным сорбентам C₁₈ но работоспособен в диапазоне pH=1—13 при концентрации буферных солей до 0,5—1 М. Кроме того, его можно использовать в эксклюзионной хроматографии для разделения молекул с молекулярной массой от 2X10³ до 10⁵, а также в ион-парной хроматографии.

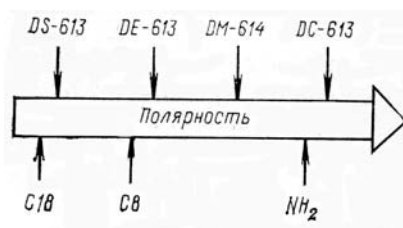


Рис. 4.2. Полярность сорбентов RS-пак серии D в сравнении с полярностью некоторых привитых сорбентов

Сорбенты RS-пак серии D фирмы «Шова Денко», изготовленные на основе различных пористых полимеров, перекрывают широкий диапазон полярности (рис. 4.2). Эти материалы имеют размер зерен 6 мкм и выпускаются набитыми в колонки размером 150X8 мм с гарантированной эффективностью 5000 т. т. (для DM-614—4000 т. т.) на колонку.

Сорбент DS-613 представляет собой гидрофобный полистирольный гель, похожий на PRP-1. Материалы DE-613, DM-614 и DC-613 изготавливают на базе полиметакрилата, гидрофильного сложного полиэфира и полистирола с гидрофильными дестителями соответственно. Сорбент DM-614 по полярности занимает промежуточное положение между привитыми сорбентами C₈ и NH₂ и может применяться как в обращенно-фазном, так и в нормально-фазном варианте ВЭЖХ.

Все сорбенты RS-пак серии D устойчивы в диапазоне pH=2—12, характеризуются практически полной адсорбционной инертностью и высокой разделяющей способностью.

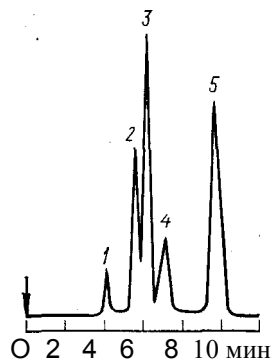


Рис 4.3. Хроматограмма компонентов таблеток от головной боли, полученная на колонке шодекс RS-пак DM614 размером 150x8 мм при 27 °С, скорость потока 0,6 мл/мин, подвижная фаза — раствор 0,035 М по Na_2HPO_4 , 80 М по KH_2HPO_4 +35% метанола, детектор УФ (254 нм):

1 — аспирин; 2 — амидопирин; 3— антипирин; 4—кофеин; 5 — фенацетин

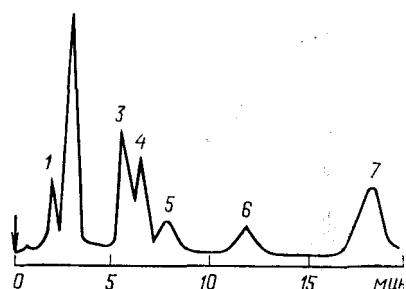


Рис 4.4. Хроматограмма нуклеозидов, полученная на колонке PRP-1 размером 150X4,1 мм, скорость потока 0,75 мл/мин, подвижная фаза — 85,7% tM раствора (Na_2BO_3 , 14,3% ацетонитрила, pH=9,0:

1— цитидин; 2 — уридин; 3—инозин; 4—гуанозин; 5—ксантозин; 6— тимидин; 7 — аденозин

На рис. 4.3 и 4.4 приведены примеры разделения компонентов таблеток от головной боли и некоторых нуклеозидов на сорбентах этого типа.

Наряду с перечисленными выше материалами выпускаются также некоторые полимерные сорбенты специального назначения. Примером может служить колонка « μ -сферогель—7,5% карбогидрат», предназначенная для анализа низших олигосахаридов и полиолов. Сферический сорбент, которым заполнена эта колонка, представляет собой кальциевую соль сульфированного стирол-дивинилбензольного геля с плотностью сшивки 7,5% и диаметром зерна 8 мкм. Размеры колонки 300X7,5 мм, рабочая температура 80—90 °С, предел давления 7 МПа, максимальная скорость подвижной фазы (вода, возможна добавка до 30% ацетонитрила) 0,6 мл/мин, гарантированная эффективность 27000 т. т./м. На рис. 4.5 показана хроматограмма смеси сахаридов на этой колонке.

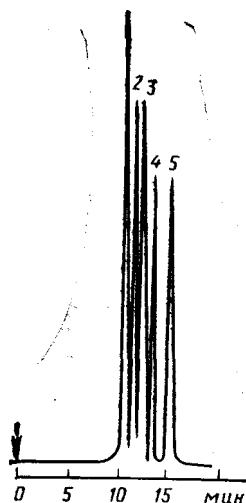


Рис. 4.5. Хроматограмма сахаридов, полученная на колонке « μ -сферогель—7,5% карбогидрат». Подвижная фаза — вода, скорость потока 0,6 мл/мин, температура 85 °С, детектор — рефрактометр:

1—декстран; 2—мальтотриоза; 3 — мальтоза; 4 — декстроза; 5 — фруктоза

Последние достижения по использованию полимерных сорбентов в ВЭЖХ рассмотрены в работе, где описано их применение для разделения аминокислот и органических кислот, пептидов, белков, углеводов, неорганических ионов и различных полимеров.

4.5. СОРБЕНТЫ ДЛЯ ЭКСКЛЮЗИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

В эксклюзионной хроматографии разделение происходит на колонках, заполненных пористыми сорбентами (гелями), которые должны иметь большой объем пор, выдерживать достаточно высокие давления и не взаимодействовать с анализируемыми веществами. Эти сорбенты подразделяются на две группы, каждая из которых имеет свои достоинства и недостатки—полужесткие (органические) и жесткие (неорганические) гели. Последний не являются гелями в собственном смысле этого слова, так как их пористая структура сформирована заранее и не связана с набуханием в растворителе. Такие материалы принято называть аэрогелями.

В данной главе будут рассмотрены только гели с размером частиц 5—20 мкм, которые используют в современной высокоэффективной хроматографии. Свойства наиболее известных материалов приведены в приложениях 1.4 и 1.5.

Главной характеристикой сорбентов для эксклюзионной хроматографии является размер пор, определяющий диапазон молекулярных масс, которые можно разделить на данном геле. Этот диапазон определяют по соответствующей калибровочной кривой, построенной в координатах $V_R - \lg M$. Сорбенты с очень узким распределением пор по размерам характеризуются высокой разрешающей способностью в небольшом диапазоне молекулярных масс. Напротив, более широкое распределение пор приводит к увеличению диапазона разделения за счет снижения разрешающей способности. Наилучшими характеристиками обладают сорбенты с умеренно узким распределением пор, которые имеют максимальную длину линейного участка калибровки.

В связи с практической важностью данных по диапазонам проницаемости в этом разделе приведены калибровочные кривые для многих наиболее известных материалов. Последние существенно облегчают сравнение и правильный выбор сорбентов для решения конкретных аналитических задач.

4.5.1 Полужесткие гели

Эти органические гели представляют собой сшитые сополимеры с большой плотностью сшивки, способные ограниченно набухать в используемых растворителях.

Гидрофильные гели предназначены для работы в водных растворах, а гидрофобные — в органических средах. Наиболее типичными представителями полужестких гелей являются сшитые сополимеры стирола с дивинилбензолом с размером частиц 10 мкм и менее, предназначенные для работы в органических растворителях. Они выпускаются с широким набором пор, охватывающим весь возможный диапазон разделения по молекулярной массе (от 10^2 до 10^8) и выдерживают давление до 10—20 МПа. Эти материалы поступают в продажу только в виде готовых колонок с эффективностью до 20—50 тыс.т.т./м, которые широко применяют для исследования синтетических полимеров и олигомеров. Размер пор стирол-дивинилбензольных гелей нельзя измерить абсолютными методами, к тому же для одного и того же сорбента в разных растворителях он неодинаков, так как набухаемость геля в них различна. Поэтому для этих материалов размер пор оценивают в условных единицах, представляющих собой максимальную длину вытянутой цепи молекулы трансполистирола в ангстремах, которая уже не способна проникать в поры геля, при использовании тетрагидрофурана в качестве подвижной фазы.

Большинство колонок со стирол-дивинилбензольными гелями можно использовать при температурах до 140—150°C, что позволяет проводить разделение наиболее трудно растворимых димеров, например полипропилена. Ассортимент подвижных раз, совместимых с этими материалами, ограничен главным образом тетрагидрофураном, ароматическими и хлорированными углеводородами. Для ряда полярных полимеров часто применяют диметилформамид. Нельзя использовать воду, спирты, сложные эфиры, ацетон и другие полярные растворители.

Гели с наиболее мелкими порами, имеющие предел эксклюзии до 5000, часто используют для разделения малых молекул. Диаметр пор самых мелкопористых сорбентов (типа μ -стирогеля 100 А) в набухом состоянии составляет около 3 нм, степень их набухания является наиболее высокой, а круг пригодных подвижных фаз более узок, чем для гелей с крупными порами. Ограничения в выборе подвижных фаз подробнее рассмотрены в разд. 2.4.4.

Большинство современных полужестких гелей выдерживает давление 10—15 МПа. Однако, фирма «Шова Денко» для вы-вускаемых ею колонок Шодекс устанавливает значительно меньшие предельные давления (≤ 2 МПа для сорбентов с размером зерна около 10 мкм). Авторам не удалось выяснить причину столь жесткого ограничения; к тому же в литературе имеются примеры разделения на наборах колонок Шодекс, где давление как минимум вдвое превышало рекомендованные фирмой пределы (см. рис. 2.21).

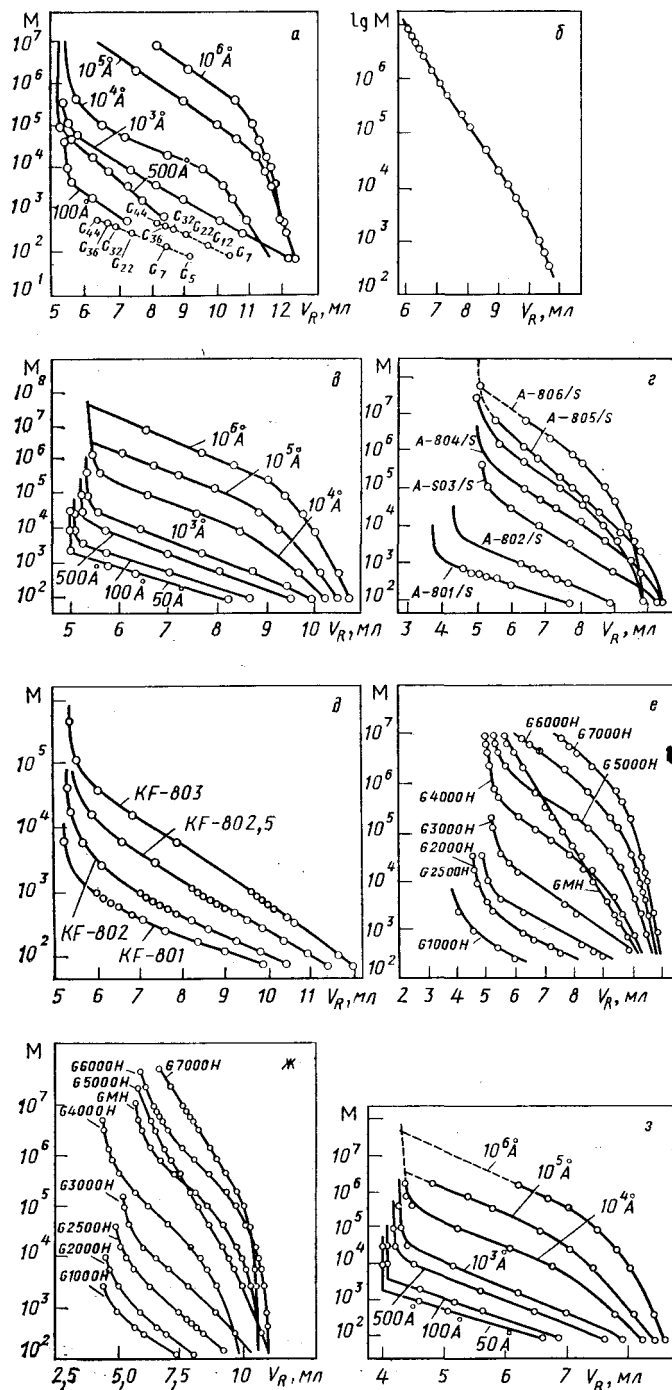


Рис. 4.6. Калибровочные кривые стирол-дивинилбензолных гелей (по полистиролу в тетрагидрофуране).

а — μ -стирогель; б — ультрастирогель линейная; в — μ -сферогель; г — шодекс А-800/С;
 д — шодекс KF-800; е — TSK-гель Н; ж — TSK-гель НХL; з — микрогель 10

Колонки со стирол-дивинилбензолными сорбентами, выпускаемые разными фирмами, заметно различаются по эффективности и размеру линейного участка калибровочной кривой (рис. 4.6). Эти различия вызваны особенностями микроструктуры пор, размером и тщательностью сепарирования и упаковки частиц сорбента. Наиболее эффективными являются колонки шодекс типа KF, ультрастирогель и TSK-гель серии XL. Гарантированная эффективность этих колонок достигает 45—50 тыс. т. т./м. Линейный участок калибровочной кривой для стирол-дивинилбензолных гелей обычно соответствует изменению молекулярной массы в пределах 1—2 порядков.

Некоторые фирмы выпускают специальные колонки, заполненные смесью сорбентов различной пористости в таких соотношениях, которые обеспечивают наилучшую

линейность калибровочной кривой в диапазоне 4—5 порядков. Естественно, что разделительная емкость таких колонок относительно невелика, но они очень удобны для предварительного исследования полимерных материалов с неизвестным ММР, а также для быстрого сравнительного анализа различных образцов, в частности, в аналитическом контроле производства.

Большой интерес для эксклюзионной хроматографии представляют гели сферон. Эти макропористые сорбенты с высокой плотностью сшивки получают сополимеризацией оксиэтилметакрилата с этилендиметакрилатом. Они набухают как в воде, так и во многих органических растворителях, в частности, в тетрагидрофуране. Степень набухания гелей в разных растворителях почти одинакова и не меняется в широком интервале значений pH и ионной силы, что позволяет рассматривать их как универсальные сорбенты для эксклюзионной хроматографии в органических растворителях и водных системах. Иногда можно заменять водный растворитель на органический в процессе разделения, т. е. работать в режиме градиентного элюирования.

Гели сферон обладают высокой удельной поверхностью (50—200 м²/г), механической прочностью (допустимое давление выше 10 МПа) и термостойкостью до 200 °С. Выпускается пять типов гелей разной пористости с пределом эксклюзии по декстрану от 6·10⁴ до 10⁸. Нижний предел проницаемости гелей всех типов одинаков и составляет около 10³. Высокая химическая стойкость позволяет использовать сфероны в диапазоне pH = 1—12.

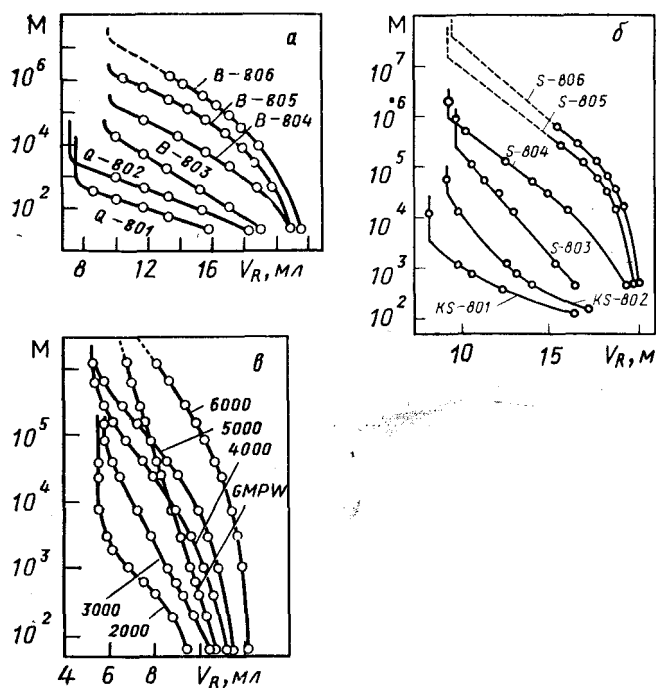


Рис. 4.7. Калибровочные кривые полужестких гидрофильных гелей:
 а — шодекс ОН-пак (по полиэтиленгликолю); б — шодекс ионпак (по декстрану);
 в — TSK-гель PW XL (по полиэтиленгликолю)

Для ВЭЖХ используют фракции сферона с размером зерен менее 25 мкм, которые очень желательно дополнительно седиментировать. С 1985 г. начат выпуск сорбентов сферой микро с размером зерен 12, 16 и 20 мкм, которые отличаются более узким распределением по размеру частиц и повышенной механической прочностью. В литературе приведено много примеров использования сферонов для разделения гидрофильных полимеров, белков, нуклеиновых кислот и других биологических объектов. При этом неоднократно наблюдали заметную адсорбцию некоторых биополимеров на матрице геля, что иногда повышает эффективность разделения.

В последние годы разработан ряд новых полимерных сорбентов для эксклюзионной хроматографии в водных системах. На рис. 4.7 приведены калибровочные кривые для некоторых материалов. Гели шодекс ОН-пак изготавливают на основе поливинилового спирта (серия Q) и полиглицидилметакрилата (серия В). Первые предназначены для разделения в низкомолекулярной области ($M < 1500$ по полиэтиленгликолю или 5000 по декстрану), а вторые — для высокомолекулярного диапазона. Оптимальная рабочая температура для колонок с этими материалами составляет 50 °С. Сорбенты типа ионпак 5 представляет собой сульфированные стирол-дивинилбензолные гели и особенно пригодны для разделения полиолов и исследования молекулярно-массового распределения полисахаридов (рис. 4.8) при рабочих температурах 40—80 °С. TSK-гели типа PW дают очень хорошие результаты при определении ММР водорастворимых синтетических полимеров (полиакриламиды, соли полиакриловой кислоты, поливинилпирролидон и т.д.), а также алейновых кислот, полиэтиленоксида и полисахаридов. Эти материалы обладают наилучшими характеристиками для высокоэффективной эксклюзионной хроматографии поликатионов в водной среде. В качестве подвижных фаз при анализе неионных веществ на этих сорбентах используют воду или 0,005 — 0,1 М водные растворы солей (например, NaCl или KCl); для разделения полиэлектролитов на TSK-геле типа PW применяют буферные системы. Наиболее мелкопористые гидрофильные гели очень эффективны для разделения низкомолекулярных соединений (рис. 4.9; см. рис. 2.20).

К недостаткам полужестких гелей следует отнести ограничение по растворителям, значительное время уравнивания колонок и возможное снижение их эффективности при замене подвижной фазы, а также относительно невысокое предельное рабочее давление. Кроме того, эффективность колонок с полужесткими гелями может резко понизиться при попадании в них пузырьков воздуха. Воздух блокирует поры геля и очень трудно удаляется. Поэтому при работе с полужесткими гелями требуется особенно тщательная дегазация растворителя и внимательная сборка хроматографической системы.

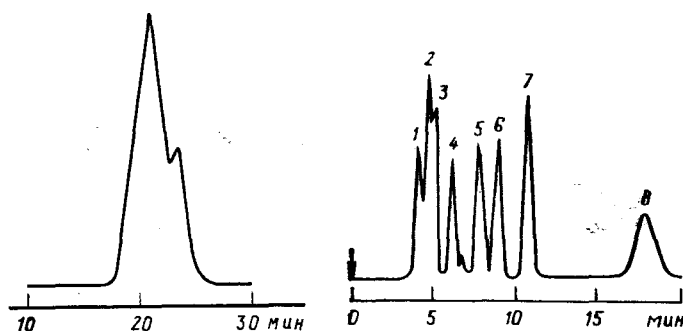


Рис 4.8. Хроматограмма α -крахмала, полученная на составной колонке 2(500X8 мм) с шодекс ОН-пак S804+S805, температура 60 °С, скорость потока 1,5 мл/мин, подвижная фаза 0,05 М раствор NaCl, детектор — рефрактометр

Рис 4.9. Хроматограмма водорастворимых витаминов, полученная на колонке шодекс ОН-пак Q-801 размером 500x8 мм, температура 50 °С, скорость потока 1 мл/мин, подвижная фаза 0,05 М раствор NaCl, детектор—УФ (210 нм):
1 - В12; 2 - В5; 3 - С; 4 - В13; 5 - В1; 6 - Е6; 7 - В3; S - В2

4.5.2. Жесткие гели

Из жестких неорганических сорбентов в эксклюзионной хроматографии используют, главным образом, силикагели и в значительно меньшей степени пористые стекла. Основными достоинствами этих материалов является возможность использования с любым растворителем, простота их замены, высокая устойчивость к давлению и

температуре и относительная легкость упаковки, колонок. Главный недостаток жестких гелей — адсорбционная активность, которая в наибольшей степени выражена у пористых стекол. Для ее устранения поверхность модифицируют силанизацией или прививкой различных групп, в частности сложноэфирных (μ -бондагель E), остатков глицерина (гликофаза G/CPG) и др. К сожалению, модификацией поверхности полностью подавить адсорбцию обычно не удается. Поэтому приходится устранять ее путем различных добавок к подвижной фазе, которые взаимодействуют с сорбентом сильнее, чем анализируемые вещества. При работе в органических средах в качестве модификаторов часто применяют тетрагидро-фуран и додигликоли (если, конечно, нельзя по каким-либо причинам, вести разделение в чистом полярном растворителе). При работе в водных растворах и анализе полиэлектролитов к элюенту добавляют, различные соли (иногда кислоты и основания), подавляющие: адсорбционные и полиэлектролитные эффекты. Другой недостаток жестких гелей—ограниченное разрешение в области низких молекулярных масс: для данного диапазона лучше использовать полужесткие сорбенты.

Первоначально для разделения полимеров применяли различные промышленные силикагели. Изучен ряд силикателей, выпускаемых в СССР, и предложен набор из четырех марок (КСК-2; КСК-1; силохром СХ-1 и МСА-2500), перекрывающий диапазон молекулярных масс от 10^3 до 10^6 . Главный недостаток промышленных силикагелей заключается в плохой воспроизводимости их характеристик за счет весьма широких допусков, которые вполне допустимы при их использовании в технике. Кроме того, существенным затруднением является необходимость размолва и выделения узких фракций с требуемым размером частиц, как описано в разд. 5.1. Поэтому были разработаны силикагели, специально предназначенные для эксклюзионной хроматографии. Первым из таких сорбентов был лихросфер. Сферические частицы сорбента имеют большой удельный объем пор, хорошие механические свойства и позволяют получить колонки достаточно высокой эффективности.

Значительно лучшие результаты достигаются при использовании зорбакса PSM, получаемого по особой технологии. Этот сорбент выпускают с тремя размерами пор, перекрывающих диапазон молекулярных масс от 10^2 до $2 \cdot 10^6$. Для снижения адсорбции при работе в органических растворителях его поверхность силанизируют, а в водных системах используют не обработанный сорбент. Зорбакс PSM характеризуется исключительной однородностью пор, что в сочетании с малым диаметром частиц и их умеренно узким распределением по размеру обеспечивает высокую эффективность колонок.

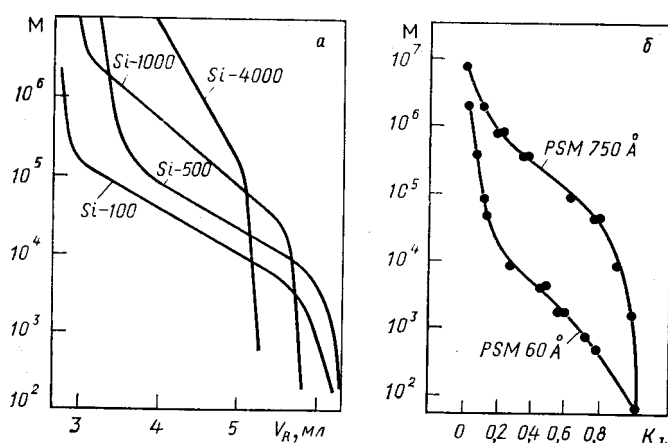


Рис. 4.10. Калибровочные кривые для жестких сорбентов (пополистиролу тетрагидрофуране): а - лихросфер; б — зорбакс PSM

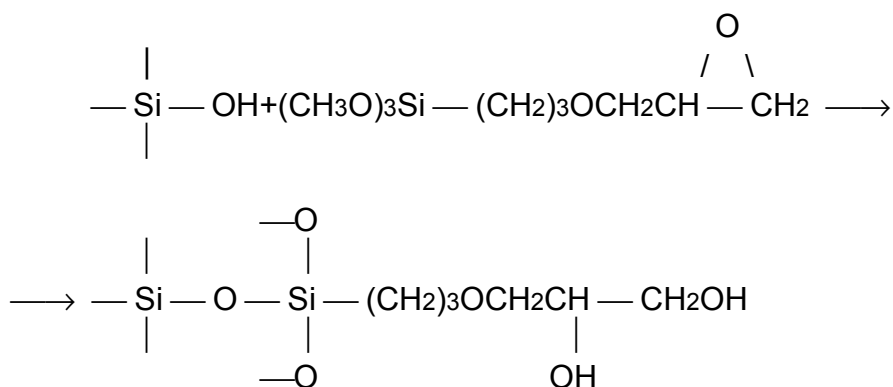
Комбинация колонок с зорбаксами PSM-60 и PSM-1000 дает линейную калибровочную зависимость в диапазоне от $2 \cdot 10^2$ до $2 \cdot 10^6$. Фирмой «Дюпон» выпущены

«тримодальные» колонки, содержащие смесь зорбаксов PSM-60, PSM-300 и PSM-3000, с линейной калибровочной зависимостью в пределах 10^2 — 10^7 . Для обеспечения необходимой селективности разделения' рекомендуется использовать наборы из двух и более колонок. Зорбакс PSM, видимо, является лучшим из жестких сорбентов, не дназначенных для исследования биополимеров. Калибровочные кривые для жестких сорбентов по полистиролу в тетрагидрофуране приведены на рис. 4.10.

Пористые стекла в немодифицированном виде в последнее время применяют редко, так как они обладают значительно большей адсорбционной активностью, чем силикагель. Отличительной особенностью пористых стекол является чрезвычайно узкое распределение пор по размеру, поэтому они характеризуются очень высокой селективностью разделения, но в малом диапазоне молекулярных масс.

К сорбентам для высокоэффективной эксклюзионной хроматографии белков, ферментов и других биологических объектов предъявляются значительно более жесткие требования по инертности поверхности, чем к сорбентам для разделения синтетических полимеров. Кислые силанольные группы силикагеля обладают высокой адсорбционной активностью, проявляют слабые ионообменные свойства и способны денатурировать белковые молекулы. Поэтому поверхность жестких сорбентов очень тщательно модифицируют прививкой монослоев нейтральных гидрофильных органических групп. К таким сорбентам относятся μ -бондагель E и материалы, содержащие глицерильные группы. Поверхность μ -бондагеля E модифицирована алифатически-ми эфирными группами. Колонки с этим сорбентом можно использовать с любыми растворителями от пентана до буферных растворов в области pH от 2 до 8. Они характеризуются высокой разрешающей способностью, но из-за малого рабочего объема (примерно 1,2 мл на колонку) требуется особо точная подача подвижной фазы.

Глицерильные (диольные) группы прививают к поверхности жестких сорбентов реакций с глицидоксипропилтриметоксисиланом [108]:



Качество получаемых сорбентов во многом определяется полнотой реакции. Теоретически в указанную реакцию может вступить примерно половина всех силанольных групп. Однако оставшиеся группы не могут взаимодействовать с сорбентами, так как экранируются глицерильными группами. При недостаточной степени покрытия полного экранирования не происходит и начинает проявляться «силанольная активность» незамещенных групп. Содержание таких активных групп, характеризующее уровень дезактивации сорбентов, часто оценивают по степени сохранения ферментативной активности лабильных ферментов после их пропускания через хроматографическую колонку.

Наиболее известными представителями материалов указанного типа является гликофаза CPG, получаемая из пористых стекол марки CPG {Controlled Porous Glass}, лихросфер диол и синхрopak GPC. Эти гели характеризуются весьма высокой инертностью: так, потеря ферментов при хроматографировании на лихросфере диол

обычно не превышает 2—7%. Сорбенты синхропак GPC, по данным фирмы, обеспечивают полное сохранение ферментативной активности.

Наилучшими свойствами для эксклюзионной хроматографии биополимеров обладают TSK-гели типа SW. Поверхность этих материалов покрыта гидрофильными ОН-группами по особой технологии, обеспечивающей исключительную инертность сорбента, практически не уступающую сефадексу. Поэтому эксклюзионное разделение, как правило, не осложняется побочными сорбционными процессами. TSK-гели SW выпускают с тремя размерами пор; и они перекрывают диапазон молекулярных масс от $5 \cdot 10^2$ до $4 \cdot 10^5$ (по декстрану) или до 10^6 (по глобулярным белкам). За счет большого объема пор колонки, с этими гелями характеризуются высокой разделительной способностью, а их гарантированная эффективность составляет 16 тыс.т.т./м. Калибровочные кривые для некоторых модифицированных жестких сорбентов приведены на рис. 4.11.

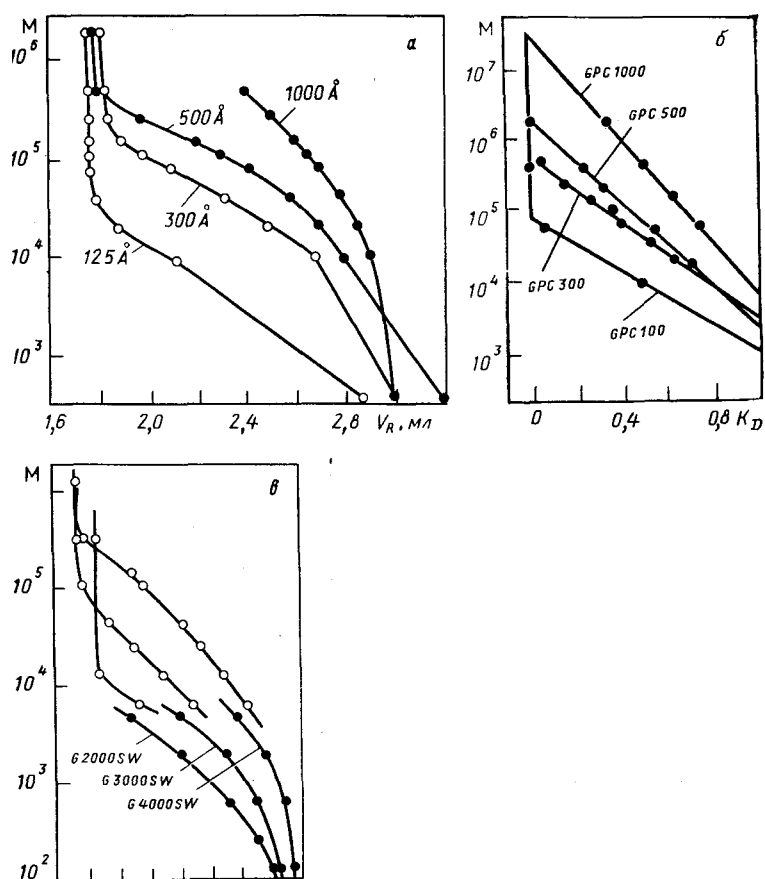


Рис. 4.11. Калибровочные кривые для модифицированных жестких сорбентов: а — μ -бондагель Е (по декстрану); б — синхропак GPC (по декстрану); в — TSK-гель SW (светлые точки — по декстрану, темные точки — по полиэтиленгликолю)

Хотя подавляющее большинство разделений на жестких гелях с привитыми гидрофильными группами проводят в водных системах, эти материалы могут быть использованы и в сочетании с полярными органическими элюентами (тетрагидрофуран, диметилформамид, этанол), что расширяет возможности их применения.

Успехи, достигнутые за последние несколько лет при разработке сорбентов для высокоэффективной эксклюзионной хроматографии, позволяют предполагать, что в скором времени будут созданы новые материалы с еще более высокими характеристиками.

4.6. СОРБЕНТЫ ДЛЯ ИОНООБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

В ионообменной хроматографии применяют разнообразные сорбенты, используемые как для разделения белков, так и для разделения неорганических ионов и небольших молекул. Эти сорбенты можно разделить на три основных вида: ионообменные смолы, пелликулярные материалы и силикагель с химически привитой фазой, обладающей ионообменными свойствами. Пелликулярные сорбенты в настоящее время практически не применяют, их используют лишь для заполнения предколонок и при воспроизведении старых методов.

Применяемые в ВЭЖХ ионообменные смолы, как правило, являются сополимерами стирола и дивинилбензола, к которым привиты ионные функциональные группы.

Синтетические смолы являются гелями, каркас которых или матрица состоит из сети пространственно закрепленных между собой углеродных цепей. С матрицей жестко соединены фиксированные ионы, несущие заряд и придающие смоле свойства ионообменника. Сама матрица гидрофобна, а гидрофильные фиксированные ионы придают ей способность к набуханию, превращая смолу в полуэлектролит. Набухаемость смолы зависит от числа поперечных связей в молекуле или сшивки.

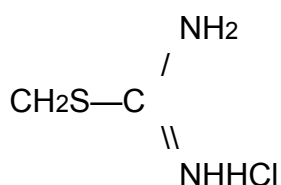
Твердость и механическая прочность сополимера стирола и дивинилбензола также зависит от степени сшивки, т. е. от процентного содержания дивинилбензола. Ионообменная смола с высокой степенью сшивки, содержащая 8—12% дивинилбензола, способна не изменять объем в различных растворителях и выдерживать большие давления без сжатия (усадки).

Обычно ионообменные смолы представляют собой микропористые сферические частицы диаметром менее 10 мкм. Сульфогруппы придают им способность к катионному обмену, а триалкиламмониевые — к анионному. Они обладают приемлемой эффективностью и высокой ионообменной емкостью. Емкость различных смол колеблется от 3 до 10 ммоль/г.

Эти материалы находят ограниченное применение из-за сравнительно низкой эффективности, что связано с очень медленной диффузией молекул образца в микропоры полимера. К достоинствам этих смол следует отнести стабильность и селективность.

Основные ионообменные смолы, применяемые в ВЭЖХ, и их характеристики приведены в приложении 2.

Интересны ионообменные хелатные смолы, которые могут связывать ионы некоторых металлов, образуя с ними комплексы более прочные, чем с ионами других металлов. Селективность смолы можно улучшить, изменяя кислотность среды. Смола ХАД-4 имеет большое число пор диаметром 50 нм и удельную поверхность 780 м²/г. Ионообменная хелатная смола хелекс 100 содержит функциональную группу иминодиуксусной кислоты —CH₂N(CH₂COO)₂—. Существуют хелатные смолы, содержащие изотиурониевую группу



или группу краун-эфира и т.д.

Другим типом сорбента, ранее применявшимся в ионообменной хроматографии, являются те же ионообменные смолы, нанесенные на пелликулярные частицы или привитые к ним. Поверхностно-пористые или пелликулярные материалы имеют тонкую пленку ионообменной смолы, обычно 1—3 мкм толщины, нанесенную на частицы

диаметром 40 мкм. Во всех случаях диффузия в тонком слое увеличивается и эффективность колонки возлагает, однако ионообменная емкость резко падает. Максимальная емкость колонки размером 2 мм X 25 см, заполненной пелликулярной ионообменной смолой, составляет около 1 мкг. для работы с пелликулярными материалами пригодны лишь фотометры и спектрофотометры. Эти материалы применяют в основном в качестве сорбента для заполнения предколонок, так как набивку ими можно проводить «сухим» способом.

Добиться высокой эффективности разделения удалось при использовании микрочастиц полностью пористого силикагеля, которому равномерно привита фаза, имеющая ионообменные группы. Силикагелевая основа делает материал более прочным. Проблемы набухания или усадки колонки редко возникают. Материал устойчив к любым буферным растворам, растворителям и высоким температурам (до 80 °С). Однако сильнокислотные или слабоосновные растворы ($2 > \text{pH} > 7,5$) могут привести к разрушению силикагелевой основы. Как правило, эффективность, полученная на привитых ионообменниках, сравнима с эффективностью обращенно-фазных материалов одинакового зернения.

Коммерческие ионообменные силикагели различаются по структуре пор и по типу присоединенной функциональной группы, по общей поверхности пор и форме частиц. Активные группы вводят сульфированием, хлорметилированием и последующим минированием. Даже если поверхность силикагеля полностью покрыта кремнеорганическими соединениями, остается большое число непрореагировавших поверхностных ОН-групп, которые ведут себя как слабые кислоты в ионообменном процессе. Вследствие этого основные ионообменники, привитые на силикагель, являются бифункциональными. К силикагелю прививают следующие группы: кислотные—карбокси-, сульфодиол-; основные — амина, алкил-амино; амфотерные аминокси- или аминокарбокси-. Обычно силикагель обрабатывают фенилтрихлорсиланом, затем сульфорируют олеумом или хлорсульфоновой кислотой. Трифенилсилильная группа более устойчива к сульфированию, чем фенил или нафтилсилильная.

В силикагелях—материалах, доступных как образцу, так и противоиону, быстро устанавливается массопередача, что приводит к высокой эффективности колонки. Силикагели с привитыми группами делятся на микро- и макропористые в зависимости от диаметра внутренних пор. Микропористые материалы, имеющие небольшие по диаметру поры, позволяют молекулам растворителя, например воды, а также небольших ионов проникать в полимерную матрицу и задерживают большие молекулы. Большинство полимерных ионообменных силикагелей имеют микроструктуру. Полимерные смолы макропористого типа зачастую используют в жидкостной хроматографии низкого давления. Макропористые силикагели с привитыми ионообменными группами стали применять при разделении больших молекул, например белков. Однако устойчивость сорбента невелика из-за растворения его в водной подвижной фазе. Информация об ионообменниках привитых к силикагелю содержится в приложении 1.3.

ГЛАВА 5

ПРИГОТОВЛЕНИЕ СОРБЕНТОВ И КОЛОНОК ДЛЯ ВЭЖХ

Сорбенты для ВЭЖХ представляют собой, как правило, очень узко фракционированные силикагели разного типа с химически привитыми фазами. Хотя исходный кусковой силикагель или размолотый и грубо сепарированный для ТСХ стоят недорого, цены на сорбенты для ВЭЖХ довольно высоки. Это связано с высокой стоимостью и малой производительностью установок для получения узких фракций силикагеля, с высокими ценами на реактивы для получения привитых фаз и сложностью прививки. Следует также отметить, что технология прививки конкретной фазы к определенному виду силикагеля может сильно различаться и давать при тех же исходных компонентах

совершенно разный конечный сорбент. Поэтому технология получения сорбентов каждого вида составляет «ноу-хау» фирм-производителей и держится в строгом секрете. Не следует поэтому, не имея сорбента, использованного в методике, которую вы намерены воспроизвести, удивляться и огорчаться тем, что методику не удастся воспроизвести. Понятие «силикагель с привитым октадецилсиланом» является столь же общим и неопределенным, как в обиходной речи, например, понятие «прибор».

Даже тот же сорбент, полученный от одного производителя, как и всякий сложный химический продукт, может в определенных пределах варьироваться по своим свойствам и хроматографическим качествам в зависимости от партии, времени выпуска и т.д. Часто фирмы, выпускающие сорбенты и заполненные ими колонки, используют для заполнения колонок сорбент улучшенного фракционного состава или просто более мелкий с целью убедить хроматографистов в невозможности полудня «самодельных» колонок со столь же высокими параметрами эффективности, симметрии пиков, проницаемости и т.д.

Следует принять за правило, что наилучшим путем для получения воспроизводимых результатов анализа является использование для заполнения колонок одного и того же сорбента, желательно одной партии. Технология упаковки колонок этим сорбентом также не должна изменяться. Если есть возможность получать готовые заполненные колонки, это существенно упрощает работу и позволяет сосредоточиться на самой хроматографии. То же относится и к использованию готовых сорбентов для ВЭЖХ.

К сожалению, даже хорошо оснащенные лаборатории редко имеют широкий выбор сорбентов и колонок для ВЭЖХ ввиду их высокой стоимости и очень широкого ассортимента. Кроме того, часто в научной практике возникает необходимость иметь, например, силикагель с определенным размером и объемом пор и силикагель со специфическими привитыми фазами, которые могут обеспечить требуемое разделение. В этом случае наиболее быстрым и рациональным является получение сорбента и упаковка колонок своими силами, что требует, конечно, определенной квалификации.

5.1 ПОЛУЧЕНИЕ УЗКИХ ФРАКЦИЙ ДЛЯ ВЭЖХ ИЗ СИЛИКАГЕЛЯ ДЛЯ ТСХ И ПРОМЫШЛЕННОГО СИЛИКАГЕЛЯ КСК-2

Оборудование, необходимое для получения узких фракций силикагеля в количествах, достаточных для ВЭЖХ, может быть очень несложным: несколько одинаковых термостойких химических стаканов, стеклянные палочки с резиновыми наконечниками, секундомер или часы, сушильный шкаф, дистиллятор для получения воды в достаточных для работы количествах. Желательно, но не обязательно иметь систему для ультразвуковой обработки суспензий. Если исходный силикагель кусковой, нужно иметь для помола мельницу достаточной производительности, не загрязняющую размалываемый силикагель (например, даровую фарфоровую).

Если исходный силикагель берут в готовом виде, например, силикагель для ТСХ марки Л 5/40 производства ЧССР (он должен быть без связующего гипса и без УФ-индикатора), то процесс его размолота отпадает. Перед тем, как начинать седиментацию этого или другого молотого силикагеля, желательно рассмотреть под микроскопом каплю его суспензии при увеличении в 100—500 раз с мерной шкалой с целью установить, присутствуют ли в достаточном количестве частицы размером от 3 до 2 мкм. Если они практически отсутствуют, значит, необходим дополнительный размол.

Сорбент получают следующим образом. В стакан вместимостью около 1 л засыпают исходный силикагель слоем около 3 см, заливают его водой, тщательно перемешивают и доводят высоту слоя суспензии точно до 12 см. Тщательно перемешав суспензию, оставляют ее стоять 15 мин, выпавший осадок отбрасывают, а суспензию переливают в другой стакан. Добавив воду снова до высоты слоя суспензии 12 см, оставляют ее стоять 1 ч. Выпавший осадок оставляют в стакане, суспензию переливают в другой стакан, добавляют воду до высоты слоя 12 см. Тщательно перемешав, оставляют суспензию стоять еще 2 ч. Выпавший осадок оставляют в стакане, суспензию переливают

в новый стакан и добавляют воду до высоты слоя суспензии 12 см. Перемешивают, оставляют на 4 ч, выпавший осадок оставляют в стакане, а суспензию выливают. В результате проделанных операций получают одно-, двух- и четырехчасовые осадки.

Одночасовой осадок суспендируют, осторожно перемешивая стеклянной палочкой с резиновым наконечником в воде, доливают воду до высоты слоя 12 см и оставляют на 20 мин. Осадок отбрасывают, суспензию переливают в другой стакан, доливают воду до 12 см, перемешивают и оставляют на 1 ч. Выпавший одночасовой (второй) осадок оставляют в стакане, суспензию переливают в другой стакан, доливают воду до высоты слоя 12 см, перемешивают и оставляют на 2 ч. Выпавший осадок оставляют, а суспензию выливают. Выпавшие за 20 мин и за 2 ч осадки, которые уже имеют заметно суженный фракционный состав, собирают отдельно и в дальнейшем, по мере их накопления, сужают дальше или же используют для высокоэффективной ТСХ или препаративной ЖХ.

Второй одночасовой осадок обрабатывают как первый одночасовой, получая конечный сорбент — третий одночасовой осадок, который имеет средний размер частиц около 14 мкм и узкий фракционный состав, что хорошо видно при рассмотрении под микроскопом капли его суспензии при увеличении в 100—200 раз.

Аналогичная обработка двухчасового осадка (интервалы времени соответственно меняются на 40 мин, 2 и 4 ч) позволяет получить конечный сорбент — третий двухчасовой осадок, который имеет средний размер частиц около 9 мкм и узкий фракционный состав. При такой же обработке четырехчасового осадка (интервалы времени 80 мин, 4 и 8 ч) получают третий четырехчасовой осадок, представляющий собой узко фракционированный конечный сорбент с частицами размером около 5 мкм.

Полученные сорбенты сушат в стаканах при температуре около 150 °С в сушильном шкафу 6 ч до постоянной массы, после чего охлаждают в эксикаторе и аккуратно пересыпают в широкогорлые склянки, плотно закрывающиеся пробкой. Пересыпать сорбенты следует под вытяжкой, так как они пылят, а пыль вредна для органов дыхания.

Из 1 кг исходного силикагеля для ТСХ получается по 20—40 г. каждого из сорбентов, т.е. около 70—80 г. При дальнейшем сужении промежуточных фракций тем же способом выход их еще несколько повышается. Промежуточные фракции можно использовать и для других видов хроматографии (ТСХ) или других вариантов ЖХ (полупрепаративные или препаративные разделения, очистка образцов и т. п.).

Описание получения сорбентов для ВЭЖХ, представленное выше, показывает, что процесс несложен и достаточно производителен. Полученные сорбенты по качеству не уступают имеющимся в продаже, а иногда превосходят их.

Однако при получении сорбентов этим способом следует тщательно соблюдать ряд условий. Прежде всего все операции необходимо проводить с одной партией исходного силикагеля. Нужно строго соблюдать постоянство высоты слоя суспензии в стаканах и интервалы времени. В случае ошибки всегда лучше снова взмутить суспензию и повторить седиментацию правильно. Не следует применять больших усилий при взмучивании осадка, так как это может привести к раздавливанию большого количества частиц и ухудшению фракционного состава осадка. Наконец, при возможности нужно проводить ультралевую обработку каждой суспензии, так как это способствует разрушению слипшихся частиц (комочков) и отделению от частиц прилипших к ним субмикронных пылевидных частиц наличие которых ухудшает проницаемость и эффективность колонок с таким сорбентом.

Из силикагеля марки КСК-2 узкие фракции сорбентов для ВЭЖХ получают аналогичным способом, добавляя стадию размола исходного кускового силикагеля. Выбирая мельницу для размола, всегда обращайте внимание не только на ее производительность и степень измельчения, но и на материал ее конструкции. Продукты износа корпуса и мелющих тел мельницы должны присутствовать в размолотом силикагеле в минимальном количестве. Требования к материалам мельницы несколько менее жестки, если предполагается в дальнейшем химическое облагораживание полученных сорбентов кипячением с хлороводородной, азотной кислотами или их смесью. При этом удаляются соединения металлов переменной валентности, присутствовавшие в исходном

силикагеле (в первую очередь железа, окрашивающего КСК-2 в цвета от светло-желтого до коричневого), и внесенные в процессе размола. Такую деминерализацию силикагеля часто проводят фирмы, производящие сорбенты: при этом цвет сорбента становится белым, его каталитическая активность сводится к минимуму и одновременно гидроксигируется поверхность, что необходимо для дальнейшей полной химической прививки.

Любой ли силикагель можно использовать для получения сорбентов для ВЭЖХ таким образом? Нет, не любой. Следует учитывать не только физико-химические характеристики, приведенные в паспорте и важные для использования силикагеля в качестве осушителя, носителя катализаторов или сорбентов для ГХ. Очень важной характеристикой является его стабильность в водных суспензиях и механическая прочность, так как, если силикагель непрочен в силу технологии его получения или теряет прочность в процессе размола и приготовления суспензии, он непригоден для ВЭЖХ. Прежде всего это относится к силикагелям, нашедшим широкое применение в ГХ в качестве адсорбентов, получаемым из частиц аэросила и имеющим марки силохром С-80, С-120 и др. Приступая к работе с новым видом силикагеля следует обратить особое внимание на размер пор, объем пор и технологию получения силикагеля данного вида. Чем больше объем пор и их размер, тем, как правило, менее прочен силикагель, но и тем больший интерес он представляет для такого применения, как получение сорбентов для эксклюзионной хроматографии, для анализа больших молекул в ионообменном и обращенно-фазном вариантах ВЭЖХ (белки, полипептиды и др.). Иногда сорбенты с одинаковыми или близкими характеристиками по размеру и объему пор, но полученные по разной технологии (или при нарушениях технологии), могут различаться по прочности в 2—10 раз. Особенно это относится к сорбентам, получаемым из тетраэтоисилана формованием микросфер с последующим отверждением (сорбенты типа лихросфер фирмы «Мерк»).

Поэтому можно принять за правило, начиная работу по получению сорбентов для ВЭЖХ из силикагеля новых видов или партий, не делать сразу большую порцию, а получить 4—6 г сорбента и испытать его, заполнив несколько колонок при разных давлениях и испытав их характеристики. Если, например, уже при давлении набивки около 20 МПа колонка имеет резко увеличенное (по сравнению с другим сорбентом из механически прочного силикагеля той же фракции) сопротивление потоку растворителя, то трудно рассчитывать на то, что удастся получить высокоэффективные колонки, заполненные сорбентом этого вида с частицами размером около 5 мкм. Если же колонки, заполненные при 20, 40 и 60 МПа, имеют близкую проницаемость, можно делать большую партию сорбента и быть уверенным в ее качестве.

5.2 СУСПЕНЗИОННЫЕ МЕТОДЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ КОЛОНОК ДЛЯ ВЭЖХ

Приготовление колонок для ВЭЖХ из частиц сорбента размером от 3 до 12 мкм долго было для специалистов по ВЭЖХ труднопреодолимой проблемой. Так как при измельчении любых твердых тел их поверхность контакта резко возрастает, мелкие частицы приобретают способность заряжаться, слипаться в трудно разрушаемые комочки либо отталкиваться друг от друга с образованием неравномерно распределенных пустот.

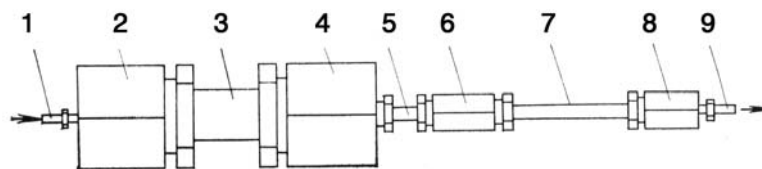


Рис .5.1. Схема устройства для суспензионного заполнения колонок:

1—капилляр для подачи растворителя от насоса; 2—верхний фитинг резервуара; 3—резервуар для суспензии; 4—нижний фитинг резервуара; 5—предколонка; 6—рассверленный под наружные диаметры колонки и предколонки фитинг; 7—колонка; 8—фитинг колонки; 9—слив растворителя в мерный цилиндр

Сорбент в заполненной традиционным методом «насыпай и уплотняй постукиванием» колонке для КХ после того, как в нее подавали растворитель, уплотнялся с образованием пустот в начале колонки, при этом форма пиков получалась неправильной, а эффективность колонки — низкой.

Разработка суспензионных методов приготовления колонок позволила резко поднять эффективность и использовать сорбенты размером 10 мкм и меньше. Однако суспензионный метод еще недостаточно отработан, и существует множество его вариантов, каждый из которых имеет свои особенности. Часто тот вариант, который описан в литературе, не дает в других руках хороших результатов, так как невозможно описать и воспроизвести все детали процесса суспензионной упаковки.

Вкратце процесс суспензионной упаковки выглядит следующим образом. Взвешивают требуемое для колонки данного размера количество сорбента, заливают его растворителем и приготавливают суспензию, тщательно перемешивая смесь, нередко с использованием ультразвука. После этого суспензию помещают в резервуар, соединенный с колонкой, на конце которой установлен фитинг с фильтром (рис. 5.1), и под давлением 20—60 МПа продавливают суспензию через колонку, подавая резервуар насосом растворитель. Суспензия фильтруется на фильтре колонки, формируя упорядоченный слой сорбента, обеспечивающий эффективное разделение при ВЭЖХ. Останавливают поток растворителя, дают давлению упасть до нуля и снимают колонку. Аккуратно удаляют избыток сорбента с конца колонки, присоединявшегося к резервуару, и присоединяют второй фитинг с фильтром. Полученную таким образом колонку устанавливают на хроматограф, прокачивают через нее до установления равновесия рабочий растворитель, после чего она готова к работе.

При всей кажущейся несложности процесса суспензионной упаковки колонок для ВЭЖХ у начинающего хроматографиста, так же как и у имеющего опыт, но начинающего работать с новым сорбентом, возникает ряд вопросов. Какой растворитель взять для приготовления суспензии? Какую концентрацию суспензии использовать? Как лучше диспергировать сорбент? Какой формы и объема применить резервуар для суспензии? Какой насос лучше для подачи растворителя? Какое направление потока растворителя выбрать и какой взять растворитель? Какое давление использовать и сколько растворителя подавать? Сколько времени снижать давление? Как выравнивать слой сорбента и устанавливать фитинг и фильтр? На каждый вопрос существует ряд ответов, а выбор удачной комбинации вариантов всегда обусловлен не только собственным опытом, но и какими-либо общими представлениями, литературными данными и, наконец, имеющимся в наличии оборудованием.

Начать целесообразно с сорбента, который упаковывают в колонку. Прежде всего желательно под микроскопом при увеличении в 200—600 раз рассмотреть каплю суспензии сорбента в подходящем растворителе. Этот простейший тест покажет, есть ли в сорбенте пыль (она может быть из-за недостаточно узкого сепарирования на фирме-производителе или вследствие измельчения сорбента в процессе транспортировки или прививки фазы), узко ли сорбент сепарирован, какова форма частиц. Если много

пылевидных или крупных частиц, целесообразно провести седиментацию сорбента с целью сужения фракционного состава.

Растворитель для приготовления суспензии часто является определяющим фактором для качества упаковки. Так как суспензия должна сохранять стабильность, начиная от переноса ее в резервуар в течение всей упаковки, необходимо замедлить седиментацию или исключить ее. Для этого существует ряд способов. Один, называемый «методом сбалансированной плотности» и широко используемый, заключается в выборе растворителя с той же плотностью, что имеет силикагель. Этот растворитель состоит из смеси полигалогензамещенных углеводородов (обычно смесь тетрабромэтана и тетрахлорида углерода); так как плотность его равна плотности силикагеля, седиментации не происходит сколь угодно долго. Недостатком этого способа является высокая токсичность, дороговизна и трудность удаления из колонки полигалогенированных растворителей. Другой способ, называемый «методом высокой вязкости», состоит в выборе растворителя с высокой вязкостью, в котором седиментация сорбента происходит достаточно долго. Обычно это растворители, содержащие глицерин, этиленгликоль или циклогексанол. Недостатком этого способа является длительность упаковки, достигающая до нескольких часов. Третий способ, называемый «динамическим», состоит в использовании растворителей малой вязкости, упаковка при этом протекает быстро; для улучшения стабильности и уменьшения седиментации иногда используют перемешивание суспензии магнитной мешалкой в процессе всей упаковки.

Существует множество комбинированных методов, в которых используют элементы трех указанных способов в разном сочетании и с добавлением ПАВ, кислых и щелочных агентов, солей и др. При выборе растворителя следует иметь в виду, что он может давать с разными сорбентами истинные суспензии, осаждающиеся в соответствии с законом Стокса (в них частицы распределены в виде индивидуальных частиц), и «скленные» суспензии, осаждающиеся много быстрее и содержащие комочки из нескольких частиц сорбента.

Истинные суспензии осаждаются в виде плотного, трудно диспергируемого осадка. «Склеенные» суспензии осаждаются в виде рыхлого и легко диспергируемого осадка. Предпочтение следует отдавать растворителям, дающим с данным сорбентом истинную суспензию. Растворитель не должен химически взаимодействовать с привитой фазой и менять ее природу. Так, привитая аминопропильная фаза легко вступает в реакцию с альдегидными и кетонными группами, давая основания Шиффа. Применяя кислые или щелочные агенты, следует учитывать ложность гидролиза привитой фазы, растворения силикагелевой матрицы. Полибром- и полихлор-содержащие соединения могут в присутствии влаги подвергаться разложению или гидролизу (особенно при воздействии света и тепла) с выделением токсичных и реакционноспособных веществ. Образующиеся при разложении полигалогенуглеводородов агрессивные химические вещества вызывают коррозию высококачественной нержавеющей стали и других коррозионно-стойких материалов. Особенно осторожно следует применять полигалогенпроизводные в комбинации со спиртами, кетонами и другими гигроскопичными полярными добавками. Химическое взаимодействие полигалогенуглеводородов с привитыми сильными анионообменниками разрушает их.

Выбирая растворитель для приготовления суспензии, необходимо учитывать условия работы колонки. Так, силикагель разует устойчивые суспензии в воде, особенно при добавлении к ней для стабилизации аммиака до 0,001 М раствора. Однако после упаковки силикагель будет полностью дезактивирован водой и для применения в качестве адсорбента потребуются его тельная активация с использованием больших объемов абсолютного метанола или других растворителей.

Мнения о концентрации суспензии, оптимальной для упаковки колонок расходятся: некоторые авторы получают наилучшие результаты с очень разбавленными суспензиями (1—5%), другие — с концентрированными (10—30%). Очевидно, для каждой системы растворитель—сорбент существует диапазон концентраций суспензии, дающий наилучшую упаковку слоя сорбента.

Для диспергирования сорбента в суспензии успешно применяют энергичное встряхивание или перемешивание, которое не должно приводить к измельчению сорбента. Для лучшего диспергирования применяют ультразвуковые ванны, при этом указывают как на преимущество на дегазацию суспензии. Однако длительное использование ультразвукового излучателя большой мощности, погруженного в суспензию для диспергирования, нежелательно ввиду возможного измельчения частиц сорбента при соударении и ухудшения при этом фракционного состава сорбента.

Резервуар, в который заливают суспензию для последующей подачи ее в колонку, прежде всего должен быть прочным. Его рассчитывают и опрессовывают при давлении, не менее чем на 20 МПа превышающем давление при упаковке колонки. Его изготавливают обычно из трубки диаметром в 2-4 раза больше, чем у колонки, и стандартных фитингов-соединителей для трубок разного диаметра с применением обжимаемых конусов. Зная количество сорбента в колонке и концентрацию суспензии, рассчитывают требуемый объем резервуара и отрезают трубку нужной длины. Целесообразно иметь несколько резервуаров из трубок разной длины, но одного диаметра, к которым подходят два фитинга-соединителя. Переставляя фитинги, вы всегда будете иметь резервуар нужного для данной колонки объема.

Широко распространены резервуары для суспензии, выточенные из нержавеющей стали. Он представляет собой стакан с крышкой, к которой приварены или присоединены на конической резьбе фитинги для присоединения колонки и подвода растворителя. Крышка может соединяться с корпусом при помощи прокладок из инертных пластмасс или мягких металлов либо на конусах. Крышка соединяется с корпусом и герметизируется затяжкой болтов или же с помощью резьбы. Такие резервуары иногда устраивают по типу автоклавов с магнитными или механическими мешалками. Мешалку используют для приготовления суспензии в резервуаре и для поддержания ее в стабильном состоянии в процессе упаковки колонки. Это позволяет избежать седиментации сорбента из маловязких растворителей в процессе набивки, повышает однородность набивки и упрощает выбор растворителя.

Важно правильно выбрать насос для набивки колонки. Можно использовать для набивки насосы постоянного расхода или насосы постоянного давления. Однако как тот, так и другой тип насоса должен обеспечивать определенные минимальные данные по расходу и давлению растворителя.

Первый и наиболее распространенный вопрос, который приходится слышать от начинающего хроматографа, — можно ли применять для упаковки колонок и предколонок тот насос, который уже есть в хроматографе. На современных хроматографах обычно устанавливают насос, способный подавать растворитель при давлении 30—50 МПа и расходе 5—10 мл/мин. Безусловно, с помощью такого насоса можно упаковать современную высокоэффективную аналитическую колонку и предколонку. Однако учтите, что придется на время набивки отказаться от аналитической работы; насос при набивке будет работать на предельных режимах по давлению; полученные колонки будут стабильно работать при давлениях, примерно на 10—15 МПа ниже максимально возможных для вашего насоса. Поэтому решайте сами, приобретать ли отдельную систему, специально рассчитанную на работу в форсированном режиме для набивки колонок. Такая система включает насос постоянного расхода, рассчитанный на подачу растворителя с давлением 20—150 МПа и расходом 200—300 мл/мин. Такой насос работает по принципу пневмогидравлического усиления давления, в качестве источника энергии используется сжатый воздух под давлением 0,6—1,2 МПа при коэффициенте усиления давления от 30 до 150. Он позволяет упаковывать колонки любого типа (аналитические, препаративные полупрепаративные и микроколонки).

Какое направление потока лучше при набивке колонок — снизу вверх или сверху вниз — оживленно обсуждается. Однако полученные результаты не позволяют предпочесть ни тот, ни другой вариант. Неизвестно, какой растворитель лучше для подачи суспензии в колонку — тот же, что использован для приготовления суспензии, или другой. Наилучшим следует признать такой растворитель, который дает упаковку хорошего

качества и позволяет быстро уравновесить колонку с рабочим растворителем. Однако когда стоит конкретный вопрос о выборе растворителя — только литературные данные или опыт могут дать ответ.

Выбрать давление при набивке колонки очень сложно. Есть авторы, заявляющие о превосходной упаковке при давлении 3 МПа, другие настаивают на необходимости работать при 100 — 200 МПа. Начинаящий исследователь старается выбрать высокое давление, полагая, что упаковка при этом будет более плотной, а колонка — более эффективной. Исходить надо из следующих представлений. Конусные уплотнения на современных аналитических колонках достаточно надежно работают (при правильной затяжке) до давления 40—60 МПа. Некоторые силикагели, используемые в качестве матрицы, разрушаются при давлениях 20—30 МПа. Органические гели, как правило, могут работать при давлениях, не превышающих 5—10 МПа. Исходя из этого, следует принять для набивки колонок давление 20—60 МПа при использовании сорбента с силикагелевой матрицей.

При работе с новым видом сорбента или с новой партией следует упаковать сначала короткую колонку (10—12 см) при относительно невысоком давлении (20—25 МПа). При хорошем результате можно попытаться упаковать более длинную (200—250 мм) колонку при высоком давлении (40—60 МПа). Если эффективность увеличится примерно вдвое одновременно с увеличением сопротивления потоку в два раза, значит сорбент прочен, его можно использовать при таких параметрах набивки. Если сопротивление потоку возрастет в 2,5—6 раз, это значит, что сорбент непрочен и разрушается, образующаяся пыль резко увеличивает сопротивление колонки, нужно снижать давление при набивке. Особую осторожность следует проявлять при выборе давления для набивки силикагелей с широкими порами (более 10 нм) и с большим объемом пор, которые находят все более широкое применение в эксклюзионной хроматографии полимеров и в анализе биологических объектов — белков, полипептидов и др.

При упаковке колонки можно считать оптимальным объем поданного растворителя, в 4-6 раз превышающий объем резервуара для суспензии.

После того как нужный объем растворителя подан при упаковке колонки, следует перекрыть соответствующий кран. Поток растворителя останавливается тем медленнее, чем мельче зернение сорбента, длиннее колонка, более вязкий растворитель и больше объем резервуара для суспензии. До полной остановки потока из колонки, что отнимает обычно 1-6 мин, ни в коем случае не следует отсоединять колонку, так как слой сорбента в колонке может быть разрыхлен при резком снижении давления. После остановки потока растворителя следует отсоединить колонку от системы набивки, осторожно лезвием бритвы срезать выступающий слой сорбента заподлицо с концом колонки, снять излишки сорбента с трубки и конуса, положить фильтр на сорбент, аккуратно одеть фитинг, завернуть и затянуть гайку сначала от руки, а затем с помощью двух ключей. Затем устанавливают две заглушки, предотвращающие высыхание сорбента, после чего колонка считается готовой к хранению или тестированию.

При переходе к новой системе растворителей следует помнить, что она должна смешиваться с предыдущей системой, не вызывая при этом разделения на две несмешивающиеся фазы. Если это может произойти (например, при переходе от системы метанол — вода к системе гексан — изопропанол или от системы фосфатный буферный раствор к системе метанол — вода или ацетонитрил—вода), надо промыть колонку промежуточным растворителем, полностью смешивающимся с обеими системами растворителей. В противном случае выделившаяся гетерофаза (в приведенных примерах — это вода и соль) вызовет множество проблем: нестабильность характеристик удерживания; дрейф и нестабильность нулевой линии детектора; повышение давления на входе в колонку; искажение формы пиков; забивку капилляров и инжектора; «залипание» клапанов и т.д. Выбирая промежуточный растворитель, следует принимать во внимание его вязкость, поглощение в УФ-области и другие характеристики. Иногда приходится вести промывку даже двумя промежуточными растворителями, чтобы избежать разделения старой и новой систем растворителей на гетерогенные фазы.

Рассмотрим использование при набивке предколонки, которую устанавливают между резервуаром для суспензии и набиваемой колонкой. Некоторые исследователи считают, что такая предколонка играет важную роль в повышении качества получаемой колонки, так как она служит продолжением колонки и, имея тот же самый диаметр и соединение с колонкой «вплотную», позволяет избежать нарушения однородности слоя набивки в начале колонки, забирает излишек сорбента, предотвращает (частично) возможность выпадения сорбента изковки обратно в резервуар и удерживает все примеси, попадающие из растворителя при его прокачке. Нам не удалось отметить заметной разницы в качестве колонок, заполненных с такой предколонкой и без нее; однако в некоторых случаях применение такой предколонки целесообразно. Ее можно использовать как предколонку, заполняемую одновременно с колонкой. Если при длительной работе такой системы верхний слой сорбента загрязняется или проседает, почти всегда можно отсоединить предколонку и, одев фитинг уже на колонку, восстановить ее работоспособность без замены сорбента.

Укажем три одинаково эффективных метода набивки колонок силикагелем.

I Набивку проводят при направлении потока «снизу вверх», используя маловязкие растворители.

1. Взвесить в конической колбе вместимостью 50 мл 2,6— 3,0 г (для колонки размером 4,6 мм X25 см) силикагеля зернением 5, 7 или 10 мкм, добавить 20 мл метанола и закрыть крышкой.
2. Тщательно промыть и высушить колонку, резервуар для суспензии и все фитинги, пометить фитинги и концы колонки «к детектору» и «к инжектору».
3. Присоединить к колонке фитинг «к детектору», соединить его тefлоновым капилляром с мерным цилиндром вместимостью 100 мл.
4. Собрать резервуар, присоединить его снизу к насосу капилляром и закрепить в тисках за верхний фитинг.
5. Тщательно перемешать силикагель и метанол, встряхивая и обрабатывая в ультразвуковой ванне колбу 3—4 мин.
6. Проверить, все ли ключи, колонка и воронка для заливания суспензии находятся в удобном положении и на месте.
7. Выключить ультразвуковую ванну, тщательно перемешать суспензию и через воронку залить ее в резервуар.
8. Немедленно присоединить колонку к верху резервуара, затянуть гайку ключом и подать метанол при давлении 20—50 МПа. Если течи нет, продолжать подачу растворителя до тех пор, пока в мерном цилиндре не соберется 80 мл метанола.
9. Выключить насос, подождать 1—4 мин до полной остановки потока, отсоединить верхний тefлоновый капилляр.
10. Отвернуть нижнюю гайку колонки, осторожно отсоединить колонку от резервуара, снять излишки силикагеля с торца колонки бритвой (если при разъеме образовался «кратер» на торце колонки—заполнить его шпателем из слоя уплотненного силикагеля с верха резервуара и срезать бритвой).
11. Установить фитинг «к инжектору».
12. Поставить заглушки на фитинги колонки, установить табличку с указанием направления потока сорбента, номера колонки, даты заполнения и т.п.

В таком виде колонку хранят до тестирования или работы с выбранным растворителем.

II Набивку проводят при направлении потока «сверху вниз», используя растворители повышенной вязкости.

1. Взвесить в конической колбе вместимостью 100 мл 4— 4,2 г силикагеля, добавить 50 мл 20%-ного раствора глицерина в метаноле.
2. К колонке присоединить фитинг «к детектору», установить заглушку, присоединить к резервуару колонку и предколонку и закрепить в тисках для подачи растворителя «сверху вниз».

3. Заполнить колонку раствором глицерина в метаноле.
4. Приготовить суспензию, тщательно перемешав силикагель и растворитель и поместив колбу на 5 мин в ультразвуковую ванну.
5. Залить суспензию в резервуар, долить до верха раствором глицерина в метаноле, чтобы не оставалось воздуха, завернуть фитинг резервуара и присоединить к нему капилляр от насоса.
6. Снять заглушку с колонки и сразу подать воду насосом под давлением 70 МПа.
7. Через 4—5 мин (для сорбента с частицами 10 мкм) вся суспензия будет продавлена через колонку. Подачу воды прекратить, дать давлению упасть до атмосферного и отсоединить колонку с предколонкой.
8. Отсоединить предколонку, выравнять сорбент на торце колонки шпателем и присоединить фитинг «к инжектору».
9. Пропустить через колонку 200 мл абсолютного метанола для удаления воды и глицерина.
10. Поставить заглушки на колонку и установить табличку с данными колонки.

III Набивку проводят при направлении потока «сверху вниз», используя растворитель сбалансированной плотности.

1. Взвесить в конической колбе вместимостью 100 мл 4—4,2 г силикагеля, добавить 50 мл растворителя (60% масс. тетрабромэтана и 40% масс. тетрахлорэтилена).
2. К колонке присоединить фитинг «к детектору», установить заглушку, присоединить предколонку, заполнить колонку и предколонку тем же растворителем, присоединить к резервуару и закрепить в тисках для подачи растворителя «сверху вниз».
3. Приготовить суспензию, тщательно перемешав силикагель и растворитель и поместив колбу на 5 мин в ультразвуковую ванну.
4. Залить суспензию в резервуар, осторожно долить до верха гептаном, не оставляя воздуха.
5. Завернуть фитинг резервуара, присоединить капилляр от насоса, снять заглушку колонки и немедленно подать гептан насосом под давлением 50 МПа.
6. Прекратить подачу растворителя и дать давлению упасть до нуля как только вся суспензия будет продавлена через колонку и появится гептан.
7. Отсоединить колонку с предколонкой, отсоединить предколонку, выравнять слой силикагеля на торце колонки и присоединить фитинг «к инжектору».
8. Пропустить через колонку 200 мл абсолютного метанола.
9. Поставить на колонку заглушки и табличку с ее данными.

Все три метода дают возможность получить колонки с силикагелем, заполненные однородно и обеспечивающие высокую эффективность разделения. С сорбентом зернением 10 мкм удается получить колонки длиной 25 см, имеющие эффективность обычно от 4 до 8 тыс. т. т., имеющих приведенную высоту теоретической тарелки от 3 до 6. При использовании имеющихся в продаже не очень узко сепарированных сорбентов это является хорошим результатом. Если использовать очень узкие фракции силикагеля и хорошо их обеспылить седиментацией, удастся получить колонки с эффективностью до 12 тыс. т. т., имеющих приведенную высоту теоретической тарелки, приближающуюся к 2.

Значительно сложнее набивка колонок сорбентами с химически привитыми фазами. Выбор методики заполнения колонок такими сорбентами основывают на использовании данных по набивке фирмы-производителя или применяют оригинальные методики, описанные в литературе.

Последние являются наиболее надежными, но зачастую не содержат подробностей, и поэтому дают неудовлетворительные результаты при попытке их воспроизвести. Так как химия поверхности сорбентов с привитыми фазами, особенно обращенно-фазных, сложна, можно обсуждать метод упаковки только конкретного сорбента. Попытка

применить описанный в литературе или использовавшийся исследователем метод упаковки другого сорбента «с той же химически привитой фазой на той же матрице» (например, октадецилхлорсилан, привитый к силикагелю), как правило, приводит к неудаче и только как исключение — дает хороший результат.

Опыт автора подтверждает, что даже для новых партий одного сорбента той же фирмы может потребоваться серьезная корректировка методики заполнения колонок, так как химия их поверхности различается в деталях от партии к партии. Надо также учитывать тот факт, что фирмы, производящие и колонки, и сорбенты, не заинтересованы в разглашении секретов упаковки своих сорбентов. Следует с осторожностью относиться к «чудодейственным» жидкостям для приготовления суспензий обращенно-фазных и некоторых других сорбентов, составы которых не раскрываются фирмами-производителями. Утверждения об «универсальности» этих жидкостей для любого обращенно-фазного сорбента и о получении «гарантированно высокоэффективных» колонок являются не более, чем рекламой. Она нередко весьма далека от реальных результатов, которые удается получить, а воспроизвести их состав в случае успеха (особенно если речь идет о полном составе) довольно затруднительно.

5.3 ЗАПОЛНЕНИЕ КОЛОНОК «СУХИМ» МЕТОДОМ

Заполнение колонок «сухим» способом возможно только старыми поверхностно-пористыми (пелликулярными) сорбентами, имеющими размер частиц 35—60 мкм, а также пористыми сорбентами на основе силикагеля с размером частиц 25—40 мкм и больше. Колонки, заполненные сорбентами первого типа, имеют невысокую эффективность по сравнению с колонками, заполненными современными сорбентами с размером частиц 5—10 мкм, и имеют малую емкость по пробе. Колонки с сорбентами второго типа также имеют невысокую эффективность, но допускают значительно большую нагрузку пробой и применяются для препаративной работы. Из-за действия поверхностных сил не удастся эффективно упаковать колонку сухим способом микрочастицами размером 3—20 мкм.

Заполнение колонок сухим способом проводят следующим образом.

1. Колонку тщательно промыть растворителями и высушить, присоединить концевой фитинг «к детектору».
2. К свободному концу колонки присоединять (на резьбе или с помощью резиновой трубки) небольшую воронку.
3. Засыпать сорбент в колонку через воронку небольшими порциями, достаточными для заполнения колонки на 2—4 мм по высоте; колонку при этом держать вертикально.
4. Уплотнить сорбент, осторожно постукивая колонкой по деревянной поверхности, медленно вращая ее и постукивая деревянной палочкой по стенке колонки примерно на уровне слоя сорбента. Постукивать колонкой несколько раз по деревянной поверхности без постукивания по стенке.
5. Добавить следующую порцию и повторять все операции, пока колонка не заполнится доверху.
6. Несколько минут осторожно постукивать заполненной колонкой по деревянной поверхности, не постукивая по стенке.
7. Отсоединить воронку, выровнять слой сорбента и установить фитинг «к инжектору».

Некоторые авторы рекомендуют использовать механическую вибрацию в комбинации с ручным вращением и постукиванием по стенке колонки, другие — комбинировать механическую вибрацию и вращение на специальном стенде.

5.4 ТЕСТИРОВАНИЕ И ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ПРИГОТОВЛЕННЫХ КОЛОНОК

Приготовленные колонки тестируют на модельной смеси веществ и стандартных растворителях с целью оценки их качества.

Для тестирования колонок с силикагелем, привитыми фазами «нитрил» и «диол» рекомендуется растворитель гексан — изопропанол (100:2 по объему), проба — по 0,5% (масс.) *o*-крезола и фенола в растворителе.

Для тестирования колонок с обращенно-фазными сорбентами (C₂, C₈ и C₁₈) рекомендуется растворитель метанол—вода или ацетонитрил—вода (70:30 по объему), проба — по 0,5% (масс.) толуола и *n*-ксилола в метаноле (ацетонитриле). Если компоненты пробы выходят слишком быстро (для обращенно-фазных сорбентов с малым содержанием привитой фазы), растворитель следует заменить на новый с соотношением компонентов 50:50.

Новая колонка, как правило, содержит растворитель набивки, отличающийся от растворителя тестирования по составу. Поэтому новую колонку устанавливают на хроматограф и подают растворитель тестирования со скоростью 1 мл/мин для колонок диаметром 4,6 мм (стандартных, аналитических). Время, в течение которого устанавливается равновесие колонки с новым растворителем, определяется по стабильности нулевой линии детектора и параметров удерживания тест-веществ и обычно колеблется от 1 до 2 ч. После установления равновесия вводят несколько раз тест-смесь и получают тест-хроматограммы.

Рассмотрение тест-хроматограмм начинают с формы полученных пиков. Пики должны быть достаточно симметричными, не иметь «носов» и «хвостов» — это наиболее частый дефект. Недопустимо двоение пиков — свидетельство наличия каналов или пустот в колонке. Коэффициент асимметрии пиков на 1/10 их высоты должен приближаться к 1, и для колонок хорошего качества должен составлять 0,8—1,3. Далее проверяют время удерживания тест-веществ на хроматограммах: постоянство этой величины свидетельствует об установлении равновесия в колонке и возможности расчета эффективности колонки. Расчет эффективности колонки — числа теоретических тарелок и приведенной высоты эквивалентной теоретической тарелки — проводят по известным формулам (см. разд. 1.1). Для имеющихся в продаже сорбентов среднего качества при хорошо подобранной методике набивки колонок удается получить значение ПВЭТТ от 3 до 6, что соответствует ЧТТ для стандартной колонки длиной 25 см от 4 до 8 тыс. (сорбент размером 10 мкм), от 5,5 до 11 тыс. (7,5 мкм) и от 8 до 16 тыс. (5 мкм).

Начинающему хроматографисту не следует огорчаться, если параметры колонки, особенно эффективность и симметрия, получаются значительно хуже. Это почти неизбежно до тех пор, пока не будет приобретен опыт работы.

5.5 ХРАНЕНИЕ, РЕГЕНЕРАЦИЯ И РЕМОНТ КОЛОНОК ДЛЯ ВЭЖХ

Колонки для высокоэффективной жидкостной хроматографии являются тонким инструментом, сердцем хроматографа и требуют бережного обращения. Ошибка оператора прежде всего сказывается на колонке; она может полностью или частично потерять свои качества в результате превышения давления, ввода нефилтрованного растворителя или пробы, неосторожного удара, слишком сильной затяжки резьбы и т.д. Поэтому правильному хранению колонок, их регенерации и ремонту необходимо уделять внимание.

Начнем с хранения колонок. Фирмы, производящие тестированные и не тестированные, а также пустые колонки для ВЭЖХ поставляют их в специальных коробках, имеющих мягкий пенополиуретановый вкладыш с гнездом для колонки или такие же прокладки. Иногда колонку дополнительно помещают в трубку из пластика и фиксируют на концах держателями. Концы колонки герметично закрывают заглушками разного типа,

предотвращающими высыхание сорбента. На самой колонке есть спецификация, в которой даны каталожный и порядковый номер колонки, ее размеры, сорбент и его зернение, направление потока растворителя и другие данные. Если колонка тестирована, то в коробке лежит тест-хроматограмма с условиями испытания колонки и его результатами, если не тестирована, то, как правило, инструкция по тестированию.

Хранить колонку желательно в коробке, в которой она получена; в ней же следует хранить всю соответствующую информацию. Желательно перенумеровать все колонки и на каждую завести паспорт, в котором следует отмечать все виды анализов и растворителей, примерную длительность работы, давление при работе и другие сведения. Хранить все коробки с колонками желательно в одном месте, надежно защищенном от ударов, вибрации, нагрева.

Перед началом эксплуатации новой колонки следует прежде всего снять и положить в коробку заглушки, так как они для разных колонок разные, и если будут перепутаны — нарушится герметичность при последующем использовании. Коробка должна иметь ту же маркировку, что и сама колонка. Всегда желательно провести ретестирование колонки в тех же условиях, в которых ее тестировали. Это позволяет установить, не потеряла ли колонка эффективность при транспортировке, проверить эффективность вашей хроматографической системы в целом (по сравнению с системой, использованной фирмой-производителем) и получить свою тест-хроматограмму для новой колонки, которая служит эталоном при следующих проверках в процессе эксплуатации колонки.

Если вы переходите на новую систему растворителей, уточните, каким растворителем заполнена колонка — это обычно указывает фирма-изготовитель или отмечено в паспорте колонки. Помните о возможности образования гетерофазной системы при смене растворителя, всегда используйте в сомнительных случаях промежуточные, полностью смешивающиеся растворители, например изопропанол.

После работы колонку следует подготовить к хранению: ее промывают и заполняют растворителем для хранения (для обращенно-фазных сорбентов—метанолом, для силикагеля—гексаном или гептаном, для ионообменников — метанолом, для других колонок—по рекомендации фирмы-производителя). Промытую колонку герметично закрывают заглушками и помещают в коробку для хранения, сделав запись в паспорте о проведенной работе и растворителе для хранения. Очень бережно следует обращаться с таблицами, прикрепленными к колонке и содержащими все данные о ней. Если таблица отклеивается или по каким-либо причинам портится (смывается растворителем надпись), необходимо сразу же изготовить и установить на колонку дубликат. Если таблицу снимают (например, при установке в термостат), ее надежно хранят, а затем снова устанавливают на колонку. Помните, что колонка без таблицы и паспорта (особенно пролежавшая какое-то время) практически бесполезна, ибо установить ее сорбент невозможно или требует большого труда. Особенно следует предостеречь от спешки при смене колонок, когда, не убрав одну колонку, достают другую для установки, кладут рядом, чем-то отвлекаются и... не могут вспомнить, какую колонку нужно поставить, а какую колонку убрать.

Вопрос о том, нужно ли при хранении герметично закрывать концы колонок, некоторыми фирмами решается положительно, а другими—отрицательно. Первые указывают, что при высыхании сорбента в колонке образуются каналы, нарушается равномерность слоя; это ведет к ухудшению эффективности, двоению пиков, ухудшению симметрии пиков. Вторые, напротив, утверждают полную идентичность колонок до и после высыхания сорбента в случае повторного тестирования. Учитывая, что некоторые сорбенты, например, полимерные при высыхании уменьшаются в объеме и при этом равномерность слоя в колонке нарушается (особенно если такая колонка в процессе транспортировки подвергается тряске и вибрациям), целесообразно герметично закрывать концы колонок.

Перейдем теперь к регенерации колонок, под которой понимают восстановление разделительных и эксплуатационных характеристик колонки, потерянных в процессе

эксплуатации. Утрата первоначальных характеристик колонки проявляется в заметном увеличении рабочего давления при том же потоке, в ухудшении разделения пиков за счет потери эффективности, появлении хвостов пиков, изменении порядка выхода компонентов, в резком уменьшении или увеличении времени удерживания компонентов и т.д.

Как правило, колонка утрачивает свои свойства в процессе эксплуатации в силу следующих причин.

Во-первых, это нарушение допустимых параметров работы колонки по потоку и давлению растворителя, возникающее из-за ошибок оператора (неправильная задача расхода, использование высоковязких растворителей и т. п.). При этом, если давление превысит значение, использовавшееся при набивке колонки, сорбент неизбежно уплотнится, просядет, в начале колонки появится пустота (мертвый объем), пики будут размываться и эффективность колонки будет утрачена.

Во-вторых, это ошибки оператора, связанные с выбором растворителя, т.е. использование растворителя с рН ниже 3 или выше 8. В этом случае происходит ускоренное разрушение, особенно при повышенных температурах, силикагелевой матрицы с растворением силикагеля, уменьшением его механической прочности, химическим отщеплением привитой фазы. Изменение природы сорбента, естественно, меняет параметры удерживания веществ и приводит к нарушению хроматографического процесса, а также к проседанию сорбента в начале колонки из-за ухудшения его прочности.

В-третьих, это загрязнение входного фильтра колонки частицами, попадающими в поток вследствие применения нефилтрованных растворителей, содержащих взвеси проб, а также появляющихся за счет износа уплотнений поршней, клапанов, инжектора. Это приводит к уменьшению числа пор фильтра, росту его гидравлического сопротивления и возрастанию давления на колонке. Необходимо фильтровать растворители и пробы и устанавливать дополнительные фильтры в линии для улавливания частиц, образующихся в процессе работы поршней, клапанов, инжектора.

В-четвертых, это химическое загрязнение колонки. Его избежать полностью не удастся, так как даже высокочистые растворители для ВЭЖХ, не говоря о технических видах, содержат некоторое количество примесей, продуктов фотохимической или окислительной деструкции растворителей, их стабилизаторов, примесей, тары и др. Пробы также содержат примеси, состав которых часто установлен не полностью. Эти примеси, если они не элюируются в условиях анализа, постепенно накапливаются на сорбенте в начале колонки и, играя роль нанесенной активной фазы, начинают избирательно удерживать некоторые компоненты пробы вплоть до их необратимой сорбции. Если эти примеси элюируются с большим временем удерживания, они приводят к нестабильности положения нулевой линии в виде дрейфа в ту или другую сторону, широких «горбов» в самые неожиданные моменты и т.д. К такому же «химическому» загрязнению, изменяющему параметры удерживания, приводит использование силикагеля, а в качестве подвижной фазы — влажного гексана или гептана, постепенно «загрязняющих» безводный силикагель водой.

Регенерацию вышедшей из строя колонки (в отличие от ремонта колонки) проводят без снятия концевых фитингов. Выбирают комплекс растворителей и химикатов, который позволяет удалить нежелательные загрязнения с сорбента и фильтров химическим или физико-химическим воздействием. Регенерация успешна только в том случае, если в процессе эксплуатации колонки не произошло физической или химической деградации слоя сорбента, т. е. образования каналов, пустот или отщепления привитой фазы. Первый вопрос, который возникает при регенерации, — это можно ли для ускорения и улучшения процесса изменить направление потока через колонку, чтобы загрязнения с сорбента и фильтра на входе сразу удалялись, не проходя через весь слой сорбента. Вопрос не праздный, так как некоторые опытные специалисты считают это возможным, а другие решительно отрицают, указывая на возможность нарушения плотности упаковки, образования каналов и т.д. Фирмы-производители также не единодушны: некоторые считают изменение направления потока через колонку опасным; другие, напротив, рекламируют свои колонки как способные работать при любом направлении потока;

третьи даже не указывают для своих колонок направления потока, полагая, что это безразлично.

Слой сорбента в колонке, по нашему мнению, не окончательно сформирован и однороден после упаковки колонки. Если после упаковки и снятия давления верхний слой сорбента в колонке выравнивается и закрывается фитингом при атмосферном давлении, то нижний слой (со стороны детектора) продолжает оставаться под давлением из-за трения слоя сорбента о стенки колонки; если снять нижний фитинг, это давление выдавливает сорбент из колонки (даже жесткий на основе силикагеля, не говоря уже о полужестких на полимерной основе) довольно заметно, в случае силикагеля на 1—1,5 мм. Поэтому изменение направления потока при регенерации колонки нецелесообразно» особенно при повышенных скоростях потока и высоком давлении. Если это все же осуществляется, следует уменьшить расход растворителя и снизить давление так, чтобы они не превышали 1/2 или 1/3 от значений рабочих параметров.

Какими растворителями и в какой последовательности вести регенерацию колонок—это зависит от типа сорбента и от предполагаемых загрязнений, которые следует удалить. Имеется много рекомендаций, какие растворители, в какой последовательности и для каких сорбентов использовать, однако никто лучше хроматографиста не знает, какие загрязнения он «посадил» на колонку и какой растворитель пригоден для их удаления. Если загрязнениями являются соли, то для их удаления лучше всего вода, если полимеры — хлороформ или тетрагидрофуран, если вода — безводные спирты, хлоруглеводороды и т.д. Для трудноудаляемых загрязнений, особенно биологических, используют диметилформамид, диметилсульфоксид, сильные буферные растворы. Не следует забывать о принципе полной смешиваемости последующего и данного растворителей, иначе возможно образование гетерофазных систем.

Для регенерации силикагелевых колонок рекомендуется использовать следующий ряд растворителей: тетрагидрофуран, метанол, тетрагидрофуран, метиленхлорид, гексан. Ряд для обращенно-фазных колонок и нитрильных фаз: вода, диметилсульфоксид, метанол, хлороформ, метанол. Ряд для аминофаз и сильных анионообменников: вода, метанол, хлороформ, метанол, вода (если аминофазу используют в водных системах растворителей). Ряд для аминофаз (неполярные растворители): хлороформ, метанол, вода, метанол, хлороформ. Ряд для сильных катионитов; вода, тетрагидрофуран, вода. Ряд для органических гелей — сополимеров стирола и дивинилбензола (эксклюзионная хроматография): толуол, тетрагидрофуран, 1%-ный раствор меркаптоуксусной кислоты в толуоле или тетрагидрофуране, тетрагидрофуран, толуол. Приведенные рекомендации могут дополняться и видоизменяться в соответствии с опытом, накапливаемым в процессе работы. Если в результате регенерации не удалось восстановить работоспособность колонки, следует попытаться провести ее ремонт.

Ремонт колонки начинают с того, что с нее снимают входную заглушку, осторожно, двумя ключами ослабляют затяжку входного фитинга и снимают его. Если фитинг имеет впрессованный фильтр, а колонка имела высокое давление при работе, вероятным является закупоривание фильтра твердыми частицами. Такой фитинг присоединяют к насосной системе, создающей высокое давление и расход растворителя, и прокачивают через него растворитель в направлении, противоположном рабочему, и при максимально возможном расходе и давлении для удаления частиц-загрязнителей. Затем фитинг помещают в ультразвуковую баню с горячим раствором ПАВ и обрабатывают 5—10 мин, после чего промывают растворителем и снова прокачивают растворитель при высоком расходе и давлении. Как правило, таким путем удается удалить большую часть загрязнений с фильтра и восстановить работоспособность фитинга.

Если фильтр не запрессован, его чистят механически, осторожно счищая частицы с поверхности жесткой щеткой, затем обрабатывают с ПАВ в ультразвуковой бане и снова механически чистят. Наилучшим решением является замена фильтра новым, однако следует соблюдать осторожность и использовать новый фильтр такой же толщины и конструкции. Если толщина нового фильтра меньше, образуется пустота вначале колонки, и пики будут размываться.

Подготовив фильтр и фитинг, их и конец колонки очищают от загрязнений (частиц сорбента, ржавчины и др.) механически и растворителями и сушат. На время работ с фитингом конец колонки, чтобы он не высыхал и из него не выпадал сорбент, закрывают пластмассовым колпачком, а колонку зажимают за нижний фитинг в тиски открытым концом вверх.

Далее переходят к осмотру верхнего слоя сорбента: в процессе работы может произойти его проседание, чем оно больше, тем труднее отремонтировать колонку и меньше шансов на успех ремонта. Если проседание небольшое, то простейший способ ремонта — заполнение пустоты стеклянными микрошариками размером 40 мкм, засыпаемыми всухую, или же пелликулярным сорбентом с такой же по типу привитой фазой. При этом мертвый объем практически исчезает и разрешение колонки восстанавливается. Если проседание большое, можно либо попробовать заполнить пустоту стеклянными шариками или пелликулярным сорбентом, либо попытаться дозаполнить колонку суспензионным методом. В последнем случае готовят суспензию сорбента в подходящем растворителе и, наливая ее в пустоту, дают сорбенту осесть, затем удаляют растворитель и повторяют операцию до тех пор, пока уровень сорбента не сравняется с верхним краем колонки. Тогда надевают верхний фитинг с фильтром, присоединяют колонку к хроматографу и прокачивают растворитель, постепенно увеличивая его расход и давление до максимально возможных, выдерживая при этих значениях и затем плавно уменьшая до нуля.

Дав потоку остановиться, снимают верхний фитинг и осматривают верх слоя сорбента. Как правило, слой сорбента несколько проседает, но пустота уже значительно меньше.

Суспензионное заполнение повторяют до тех пор, пока не будет получен стабильный слой сорбента. После этого колонку тестируют и определяют, восстановлены ли ее свойства.

Иногда, осматривая верхний слой сорбента, обнаруживают, что он загрязнен механическими или химическими примесями, изменился цвет сорбента, появились каналы. В этом случае небольшим шпателем осторожно удаляют верхний слой сорбента до того уровня, где (визуально) сорбент не претерпел изменений; образующуюся пустоту заполняют одним из указанных методов.

Колонки также ремонтируют, если произошла механическая поломка: заедание и порча резьбы на колонке, отламывание капилляра с конусом, нарушение формы конуса, отламывание части фитинга и др. Отломанный заклиненный капилляр с конусом иногда удается выбить узким пробойником, предварительно сняв фитинг с колонки, если канал достаточно широкий. Если нужно поставить новый концевой фитинг, следует взять новый фитинг того же типа и той же фирмы. При этом следует измерить глубиномером, одинакова ли их глубина, и в случае разницы компенсировать ее толщиной фильтра. После осторожного обжата нового фильтра и фитинга колонку присоединяют к хроматографу, и включив поток растворителя, проверяют герметичность.

Если ремонт не дает ожидаемого восстановления разделительных характеристик и эффективности колонки, ее оставляют для проведения менее квалифицированной работы (прикидочный анализ неизвестных образцов, анализ загрязненных проб, микропрепаративная работа и т.д.) или заполняют новым сорбентом суспензионным методом, предварительно удалив отработанный старый сорбент.

ГЛАВА 6

ПОДВИЖНАЯ ФАЗА ДЛЯ ВЭЖХ

Роль подвижной фазы (растворителя) в жидкостной хроматографии весьма многообразна. Наряду с чисто транспортной функцией растворитель активно участвует в самом процессе разделения и оказывает существенное влияние на возможности

детектирования. Часто незначительное изменение состава подвижной фазы дает возможность оптимизировать процесс, улучшить форму пиков, разрешение отдельных компонентов и даже изменить механизм разделения. Поэтому при выборе растворителей необходимо учитывать весь комплекс их свойств, в той или иной степени влияющих на проведение хроматографического эксперимента. Свойства растворителей для ВЭЖХ приведены в приложении 2.

Данные по физико-химическим характеристикам растворителей в основном взяты из наиболее авторитетных источников.

6.1. ОСНОВНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К РАСТВОРИТЕЛЯМ

Растворители, применяемые в ВЭЖХ, должны удовлетворять следующим основным требованиям: чистота, химическая инертность, совместимость с детектором, достаточная растворяющая способность по отношению к анализируемым веществам, низкая вязкость, безопасность, доступность. В некоторых случаях существенное значение имеют смешиваемость с другими растворителями, температура кипения и возможность легкого извлечения вещества из элюата.

Чистота растворителя в жидкостной хроматографии имеет очень большое значение, так как различные примеси в подвижной фазе влияют на все основные стадии процесса: подачу растворителя, разделение в колонке, детектирование и воспроизводимость результатов. Требуемая степень чистоты растворителя определяется выбранным вариантом разделения и используемой аппаратурой.

Наличие примесей в растворителе может вызвать следующие типичные затруднения.

1. Ухудшение эффективности разделения и воспроизводимости результатов (пример — неконтролируемая влажность растворителя в адсорбционной хроматографии).
2. Сильное отклонение нулевой линии и образование ложных пиков при градиентном элюировании.
3. Ухудшение возможностей детектирования (примеры—примеси олефинов в парафиновых углеводородах при УФ-детектировании, примесь этанола в хлороформе при ИК-детектировании).
4. Порча сорбента: примеси оснований приводят к растворению силикагеля; примеси диенов и других лабильных соединений осмоляются и блокируют поверхность адсорбентов, особенно оксида алюминия; примеси карбонильных соединений реагируют с привитыми сорбентами, содержащими аминогруппу; пероксиды окисляют привитые фазы и полистирольные гели.
5. Загрязнение веществ, выделяемых из элюата. В препаративной хроматографии приходится выделять вещества из очень разбавленных растворов. При этом даже незначительные примеси или добавки, которые не мешают аналитическому разделению, могут концентрироваться в извлекаемом веществе, существенно снижая его чистоту.
6. Разложение или химическое изменение компонентов пробы (типичные примеры—гидролиз многих металлоорганических соединений, окисление лабильных веществ пероксидами или растворенным кислородом).
7. Коррозия аппаратуры (пример—примесь HCl в хлорсодержащих растворителях).

Химическая инертность. Все, что сказано выше о химически активных примесях, имеет гораздо большее значение применительно к химической активности самих растворителей. Дополнительно можно отметить, что такие классы соединений, как кетоны, алифатические и ароматические амины, следует применять с особой осторожностью и только в тех случаях, когда их трудно заменить более стабильными

растворителями. Такие элюенты, как хлорорганические соединения, тетрагидрофуран и другие простые эфиры, следует использовать только свежечищенными.

Совместимость с детектором. Наиболее распространенными детекторами в настоящее время являются УФ-детекторы и дифференциальные рефрактометры. Возможность использования тех или иных растворителей в сочетании с УФ-детектором принято определять минимальной длиной волны, на которой при оптическом пути 10 мм падение интенсивности светового потока составляет 90%. Граничные длины волн, относящиеся к растворителям очень высокой степени очистки, приведены в приложении 2. Рассмотрение этих данных показывает, что с УФ-детектором практически не могут быть использованы такие растворители, как бензол, толуол, тетрахлорид углерода, диметилформамид и хлороформ, а также сложные эфиры и кетоны.

С рефрактометрическим детектором в принципе можно применять любые растворители, но его чувствительность определяется разностью показателей преломления растворителя и анализируемого вещества. Поэтому при выборе растворителя следует учитывать его показатель преломления.

Вязкость растворителя должна быть по возможности низкой, так как ее повышение ведет к ухудшению массопередачи, а тем самым и эффективности разделения, а также затрудняет работу насосов. При прочих равных условиях следует выбирать растворители, имеющие вязкость 0,5—0,7 мПа•с при температуре разделения.

Безопасность работы с теми или иными растворителями определяется их воспламеняемостью и токсичностью. Практически все растворители, применяемые в ВЭЖХ, либо имеют весьма низкую температуру вспышки, либо в определенной степени токсичны. Поэтому помещение, в котором проводят работы по жидкостной хроматографии, должно иметь эффективную приточно-вытяжную вентиляцию. На рабочем месте недопустимы плохо продуваемые и застойные зоны, так как в них могут накапливаться пары растворителей, имеющие большую плотность чем воздух. Нижний предел взрываемости многих растворителей составляет 1—2%, поэтому в застойных зонах возможно образование взрывоопасной смеси.

Во всех случаях следует выбирать наименее пожароопасные и токсичные растворители, руководствуясь соответствующими данными, приведенными в приложении. Так, диэтиловый эфир можно заменить диизопропиловым, а бензол — толуолом практически без ущерба для разделения.

С нашей точки зрения, токсичность является более важным фактором, чем пожароопасность. При хорошей организации рабочего места и тщательном соблюдении правил техники безопасности опасность загорания практически исключена, а контакта с растворителем полностью избежать невозможно. Многие ароматические и хлорсодержащие растворители обладают способностью накапливаться в организме человека. По последним данным, некоторые из них, считавшиеся ранее малотоксичными (хлороформ, тетрахлорэтилен) являются канцерогенами, поэтому работа с этими растворителями требует осторожности.

Следует отметить, что ПДК необходимо рассматривать с учетом температуры кипения растворителя: хотя метилхлорид и хлорбензол имеют одинаковую ПДК (50 мг/м³), но при прочих равных условиях в случае низкокипящего метилхлорида эта величина достигается значительно легче, чем для хлорбензола.

Температура кипения — менее существенный фактор, чем характеристики, рассмотренные выше. Ее следует учитывать в основном в двух аспектах: в надежности работы насосов и детекторов и легкости выделения вещества из элюата.

Низкокипящие растворители часто образуют пузырьки в насосах и детекторах. При использовании наиболее распространенных в настоящее время плунжерных насосов вероятность образования пузырьков тем больше, чем выше давление паров растворителя и скорость плунжера в фазе всасывания. Наличие пузырьков в насосе резко снижает точность подачи растворителя, а пузырьки в детекторе вызывают сильный шум и нестабильность нулевой линии. Для предотвращения этого явления проще всего применять растворители, температура кипения которых по крайней мере на 20—50 °С

выше комнатной. С другой стороны, при необходимости препаративного выделения вещества нецелесообразно использовать высококипящие растворители.

Смешиваемость с другими растворителями необходимо учитывать при работе в режиме градиентного элюирования и при подготовке анализируемого образца с использованием предварительного экстракционного разделения.

Следует помнить, что подвижная фаза в ВЭЖХ всегда должна быть гомогенной. Однако такие важные полярные растворители, как метанол и ацетонитрил, ограниченно смешиваются с гексаном. Для расширения диапазона концентраций, соответствующих гомогенным смесям, гексан заменяют на циклогексан или изооктан. Полная смешиваемость в подобных системах достигается заменой полярного компонента на этанол или изопропанол.

6.2. ЭЛЮИРУЮЩАЯ СИЛА РАСТВОРИТЕЛЯ И ЭЛЮОТРОПНЫЕ РЯДЫ

Взаимодействие растворителя с растворенным веществом определяется комплексом четырех основных типов межмолекулярных взаимодействий: дисперсионного, индукционного, донорно-акцепторного (включая образование водородной связи) и диэлектрического (сольватация ионов). Суммарный эффект всех типов взаимодействий определяет полярность растворителя, а преимущественное проявление какого-либо из них — его селективность.

В процессе развития жидкостной распределительной хроматографии предлагались различные способы оценки относительной полярности растворителей. В качестве меры полярности, принят параметр P' , который позволяет заметно надежнее оценивать относительную активность растворителей, чем широко используемый ранее параметр растворимости Гильдебранда. Полярность растворителя определяет его элюирующую силу: в адсорбционной и нормально-фазной распределительной хроматографии с увеличением полярности элюирующая сила растворителя возрастает, а в обращенно-фазной — снижается. Чем больше элюирующая сила подвижной фазы, тем меньше коэффициент емкости для данного вещества на данном сорбенте.

Расположение растворителей в соответствии с возрастанием их элюирующей силы называют элюотропным рядом. В адсорбционной хроматографии общепринятым является элюотропный ряд Снайдера. Растворители, перечисленные в приложении 2, расположены в соответствии с этим рядом. Мерой элюирующей силы растворителя служит величина ϵ° , экспериментально определенная для ряда растворителей на оксиде алюминия в сравнении с n -пентаном ($\epsilon^\circ=0$). Величина ϵ° пропорциональна разности удельных энергий взаимодействий растворителя и пентана с чистой поверхностью адсорбента. Для силикагеля значения ϵ° в среднем в 1,25 раза ниже, чем для оксида алюминия.

Таблица 6.1. Элюотропные серии для адсорбционной хроматографии на силикагеле

ϵ°	I	II	III
0,00	Пентан	Пентан	Пентан
0,05	Изопропилхлорид (4,2%) — пентан	Дихлорэтан(3%) — Пентан	Бензол (4%) — пентан
0,10	Изопропилхлорид (10%) — пентан	Дихлорэтан(7%) пентан	— Бензол (11%) — пентан

0,15	Изопропилхлорид (21 %) — пентан	Дихлорэтан(14%) пентан	— Бензол (26%) — пентан
0,20	Эфир (4%) — пентан	Дихлорэтан(26%) — Пентан	— Этилацетат(4%) — пентан
0,25	Эфир (11%) — пентан	— Дихлорэтан(50%) пентан	— Этилацетат(11%)— пентан
0,30	Эфир (23%) — пентан	— Дихлорэтан(82%) пентан	— Этилацетат (23%) — пентан
0,35	Эфир (56%) — пентан	— Ацетонитрил (3 %) бензол	— Этилацетат (56%) — пентан
0,40	Метанол (2 %) эфир	— Ацетонитрил (11%) — бензол	
0,45	Метанол (4%) эфир	— Ацетонитрил (31 %)— бензол	
0,50	Метанол (8%) эфир	— Ацетонитрил	
0,55	Метанол (20%) — эфир		
0,60	Метанол (50%) — Эфир		

Примечание. Указано содержание сильного растворителя (в % об.), в элюенте.

Выведенный элюотропный ряд справедлив для всех сорбентов оксидного типа и, в общем случае, практически совпадает с рядом, построенным по возрастанию диэлектрической проницаемости растворителей.

Для адсорбционной хроматографии разработаны также элюотропные серии (I—III), представляющие собой смеси растворителей с постепенно возрастающей элюирующей силой. Примеры таких серий приведены в табл. 6.1.

Влияние элюирующей силы растворителя на k' ориентировочно можно оценить по следующим соотношениям: k' изменяется в 2,2—3 раза при измерении P' на единицу (распределительная хроматография) и в 3—4 раза—при изменении ε^0 на 0,05 (адсорбционная хроматография).

6.3. СМЕСИ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

В практической работе индивидуальные растворители (за исключением эксклюзионной хроматографии) применяют редко, так как использование смесей растворителей резко расширяет возможности жидкостной хроматографии. Это относится и к регулированию элюирующей силы подвижной фазы.

В распределительной хроматографии полярность смеси растворителей А (слабый растворитель) и В (сильный растворитель) можно легко рассчитать по формуле

$$P_{см}' = V_a P_a' + V_b P_b',$$

где V_a и V_b — объемная доля; P_a' и P_b' — полярность растворителей А и В соответственно.

В адсорбционной хроматографии уже небольшие добавки растворителя В существенно увеличивают элюирующую силу, а при дальнейшем увеличении его концентрации элюирующая сила асимптотически приближается к величине ε^0 растворителя В.

Следует отметить, что в адсорбционной хроматографии лучше использовать смеси растворителей с достаточно близкими значениями ε^0 . В противном случае часто

наблюдаются «вторичные эффекты» растворителя, существенно снижающие воспроизводимость результатов. Более детально оптимизация состава смешанного растворителя рассмотрена в разделах, посвященных отдельным вариантам ВЭЖХ.

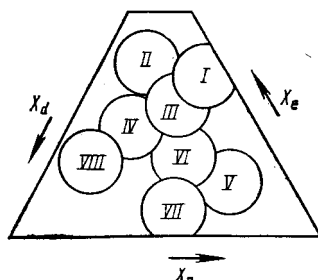
6.4. СЕЛЕКТИВНОСТЬ РАСТВОРИТЕЛЯ

При анализе многокомпонентных смесей, содержащих соединения различной химической природы, часто наблюдается перекрытие некоторых пиков. Наилучшим способом оптимизации разделения в этом случае является изменение селективности подвижной фазы при той же самой элюирующей силе.

Селективность растворителей определяется соотношением вкладов различных типов межмолекулярных взаимодействий в системе растворитель — вещество.

На предложенной Снайдером треугольной диаграмме растворители разбиты на восемь групп, различающихся по типу селективности (рис. 6.1). Крайние группы I, II, V и VIII имеют наиболее ярко выраженную селективность: в группу I ходят акцепторы протонов (простые эфиры, амины), в группу VIII—доноры протонов (хлороформ, вода, *m*-крезол), в группу II—доноры-акцепторы (спирты) и в группу V—растворители, предпочтительно взаимодействующие с веществами, имеющими большой дипольный момент (метиленхлорид, дихлорэтан). Растворители группы VII (ароматические соединения, нитроалканы) характеризуются повышенным взаимодействием с акцепторами электронов. Принадлежность растворителя к определенной группе также указана в приложении 2.

Рис. 6.1. Группы селективности растворителей:



X_e — протоноакцепторные свойства; X_d — протонодонорные свойства;
 X_n — дипольное взаимодействие

Селективность подвижной фазы изменяют путем замены растворителя В, использованного для получения необходимой элюирующей силы, на растворитель, относящийся к другой группе, и подбора такой его концентрации, которая обеспечивала бы ту же элюирующую силу подвижной фазы. В различных видах жидкостной хроматографии решение этой задачи имеет свои специфические особенности, рассмотренные в соответствующих разделах.

6.5. ОЧИСТКА РАСТВОРИТЕЛЕЙ ДЛЯ ВЭЖХ

Хорошо известно, что абсолютно чистых веществ в природе не бывает. Поэтому к вопросу о чистоте растворителя следует подходить разумно. Одни и те же примеси в разных условиях могут либо вообще не влиять на результат, либо сделать анализ невозможным. Так, незначительная примесь олефинов в алкановом растворителе совершенно не мешает при работе с рефрактометром, но практически не позволяет проводить детектирование УФ-детектором при длине волны менее 260 нм. Напротив,

даже заметная добавка гептана к гексану не окажет никакого влияния на сигнал УФ-детектора, но исказит количественные данные рефрактометра.

В адсорбционной хроматографии особое значение имеет тщательная осушка растворителей, так как даже небольшое изменение содержания воды в подвижной фазе может заметно изменить K' и степень разделения компонентов.

Требования к чистоте растворителя при градиентном элюировании значительно выше, чем при изократическом. В процессе градиентного элюирования примеси, содержащиеся в растворителях, концентрируются в начале колонки и вымываются из нее по мере возрастания элюирующей силы подвижной фазы. При этом наблюдается сильный дрейф нулевой линии, а некоторые примеси элюируются узкими зонами и регистрируются детектором в виде самостоятельных пиков. В изократическом режиме примеси в начале эксперимента также могут концентрироваться на сорбенте, но в системе достаточно быстро устанавливается динамическое равновесие, и нулевая линия выравнивается на каком-то определенном уровне сигнала детектора. Этот сигнал во многих случаях можно скомпенсировать электрически, но при этом соответственно уменьшается линейный динамический диапазон детектора.

Не менее важной является очистка растворителей от механических примесей (пыль из атмосферы, частицы адсорбентов и т.п.), которые забивают фильтры и нарушают нормальную работу насосов. Для удаления этих примесей растворители необходимо фильтровать через фильтры с размером пор приблизительно 0,5 мкм. Основными методами очистки растворителей являются перегонка и адсорбционное отделение примесей. Часто для достижения требуемой чистоты достаточно простой перегонки. Однако и в тех случаях, когда необходима адсорбционная очистка, целесообразно сначала высушить и перегнать растворитель. При этом на том же количестве адсорбента можно получить заметно больше очищенного продукта.

Общей проблемой для всех растворителей является удаление влаги. Многие растворители образуют с водой азеотропные смеси, что позволяет отделить основное количество воды отгонкой смеси. Для полного удаления влаги используют молекулярные сита — цеолиты типа NaA (4A) или KA (3A), которые предварительно активируют прокаливанием в муфельной печи при 420—450 °С.

Адсорбционную очистку проводят методом классической колоночной хроматографии. В качестве адсорбентов используют оксид алюминия и силикагель с большой удельной поверхностью (например, КСМ-5) и размером зерна 0,1—0,5 мм. Сорбенты предварительно сушат в течение нескольких часов при 250—300 °С и 160—180 °С. Обычно применяют стеклянные колонки достаточно большой вместимости с отношением высоты к диаметру в пределах 20—30 и краном, работающим без смазки. Наилучшие результаты достигаются на колонках с двумя слоями сорбента: нижнюю половину колонки набивают оксидом алюминия, а верхнюю — силикагелем.

На колонке, содержащей по 100 г этих адсорбентов, в зависимости от их активности и содержания примесей можно очистить 300—600 мл неполярных растворителей и в полтора — два раза меньше полярных растворителей типа хлороформа или тетрагидрофурана. Качество очистки обычно контролируют по пропусканию в УФ-области. Как правило, первая порция (20—50 мл) растворителя имеет недостаточную чистоту, и ее возвращают в верхнюю часть колонки. Более полярные растворители, расположенные в элюотропном ряду Снайдера ниже этил-ацетата, данным методом очищать нельзя. Очищенные растворители хранят в тщательно закрытых толстостенных бутылках из темного стекла, в которые добавляют 10—20 г активного цеолита. Из бутылей с растворителями, склонными к окислению, целесообразно перед закрытием удалить воздух продувкой сухим аргоном или азотом.

Тщательная очистка растворителей — достаточно сложный и трудоемкий процесс, и ее следует проводить только в той степени, в которой это действительно необходимо.

Алифатические углеводороды очищают от непредельных соединений обработкой смесью концентрированных серной и азотной кислот с последующей отмывкой дистиллированной водой до нейтральной реакции и осушкой. Высушенные

растворители перегоняют. Описан также метод удаления олефинов колоночной хроматографией на силикагеле, пропитанном нитратом серебра. Сорбент готовят следующим образом: на высушенный силикагель с размером зерен 100—300 мкм наносят нитрат серебра из 10%-ного водного раствора (аналогично нанесению неподвижной жидкой фазы в газовой хроматографии) и сушат при 125 °С.

Из этой группы растворителей наиболее употребительным является гексан.

Хлорсодержащие углеводороды часто содержат микропримеси хлороводородной кислоты, образующейся при их хранении, под действием которой сильно корродируют металлические детали и разрушаются адсорбенты. Кислоту удаляют адсорбционной очисткой на щелочном оксиде алюминия.

Среди хлорсодержащих растворителей особой лабильностью отличается хлороформ, который легко разлагается под действием света с образованием фосгена. Для замедления этой реакции хлороформ стабилизируют добавкой 0,5—1% этилового спирта. Таким образом, в хлороформе обычно одновременно присутствуют примеси HCl, этилового спирта и фосгена. Для их удаления продажный хлороформ промывают водой и перегоняют, отделяя основное количество воды в виде азеотропной смеси. Перегнанный хлороформ наливают в бутылку из темного стекла и добавляют 5—10% (об.) активного цеолита CaA (5A). Непосредственно перед употреблением растворитель еще раз перегоняют.

Общим правилом при работе с хлорсодержащими углеводородами является использование только свежеперегнанных растворителей. Их смеси с другими растворителями также готовят в расчете на суточную потребность.

Простые эфиры, особенно циклического строения, легко окисляются воздухом с образованием пероксидов. Присутствие последних крайне нежелательно, так как они разрушают сорбенты с привитой фазой и полимерные сорбенты, а также окисляют лабильные компоненты анализируемых смесей и поглощают в УФ-области. Наиболее часто из растворителей этого класса применяют тетрагидрофуран, обычно стабилизированный гидрохиноном. Перед перегонкой проверяют наличие пероксидов в тетрагидрофуране. К 1 мл растворителя прибавляют 1 мл 10%-ного раствора KI или NaI в ледяной уксусной кислоте. При низкой концентрации пероксида раствор окрашивается в желтый цвет, а при высокой — в коричневый. При заметном содержании пероксидов во избежание взрыва при перегонке их удаляют кипячением с 0,5% Cu_2Cl_2 в течение 30 мин. Тетрагидрофуран после удаления пероксида хранят над твердым KOH (10—15% об.) в плотно закрытой бутылке из темного стекла в атмосфере инертного газа и перегоняют непосредственно перед применением. Чистота полученного растворителя вполне достаточна для проведения эксклюзионной хроматографии на полужестких полистирольных гелях при детектировании рефрактометром. В других вариантах, особенно при работе с УФ-детектором, может потребоваться дополнительная адсорбционная очистка.

В частности, обработка тетрагидрофурана и диизопропилового эфира цеолитами NaX и CoX позволяет удалить до 90—99% пероксидов.

Относительно недавно для замены диэтилового и диизопропилового эфиров предложен новый растворитель — метил-*трет*-бутиловый эфир, который практически не образует пероксидов. Этот растворитель, видимо, найдет широкое применение в препаративной жидкостной хроматографии, так как устраняется опасность загрязнения выделяемых веществ продуктами окисления растворителя.

Следует еще раз подчеркнуть, что при перегонке растворителей, склонных к образованию пероксидов, необходимо тщательно соблюдать технику безопасности. Перегонку следует вести на водяной или силиконовой бане, не допуская перегрева растворителя. В колбу обязательно должны быть внесены свежие инициаторы кипения (лучше всего кусочки стеклянных фильтров или пористого фторопласта); перегонку необходимо прекращать, оставляя в кубе не менее 1/5 объема загрузки. Кубовый остаток можно прибавить к свежей порции растворителя, подготовленной для химического удаления пероксидов.

Ацетонитрил очищают от примесей, поглощающих в УФ-области, кипячением с перманганатом и перегонкой. В колбу вместимостью 2 л помещают 1,5 л ацетонитрила и 30 г $KMnO_4$, кипятят с обратным холодильником 1 ч и перегоняют с дефлегматором, отбирая фракции по 200 мл. Когда в кубе останется около 200 мл продукта, перегонку прекращают. Остаток можно смешивать с новой порцией растворителя. Первую фракцию отбрасывают, а остальные проверяют на поглощение в УФ-области. Для этого заполняют рабочую кювету УФ-детектора по очереди водой высшей очистки и испытуемым растворителем (сравнительная кювета заполнена воздухом). Чем меньше при этом разница показаний самописца, тем выше качество растворителя. Обычно при такой очистке получают около 1 л ацетонитрила, пригодного для работы в градиентном режиме при 254 нм. Значительно более сложная многостадийная процедура, обеспечивающая получение растворителя с ограниченной длиной волны <200 нм, описана в работе.

Изопропанол чаще всего используют как модификатор в адсорбционной хроматографии. Поэтому наиболее опасной примесью в нем является вода. Изопропанол образует с водой азеотропную смесь, кипящую при $80,3$ °С и содержащую, по разным данным, 9—12% воды. При небольшой концентрации воды в исходном продукте ее легче всего удалить путем отгонки смеси. Если же содержание воды выше 5—6%, то растворитель сначала сушат над безводным сульфатом натрия. Для удаления следов воды изопропанол выдерживают над цеолитом NaA.

Метанол. Наиболее трудно отделяемой примесью в метаноле является ацетон, который лучше всего удалять обработкой гипоиодитом натрия NaOI. Раствор 25 г иода в 1 л метанола медленно вливают при перемешивании в 500 мл 1 М раствора NaOH и добавляют 150 мл воды. Через 6—10 ч отфильтровывают образовавшийся йодоформ и кипятят фильтрат с обратным холодильником до исчезновения запаха йодоформа.

Большинство примесей, в том числе и основную массу воды, удаляют перегонкой. Для получения очень сухого продукта его выдерживают над цеолитами NaA или KA.

Вода представляет собой важнейший растворитель в обращенно-фазной и ионообменной хроматографии. Основными примесями в воде, которые мешают проведению хроматографического процесса, являются различные соли и микропримеси углеводов и других органических соединений. Присутствие солей недопустимо в ионообменной хроматографии, а примеси органических соединений вызывают существенные затруднения в обращенно-фазной хроматографии (особенно в градиентном элюировании) при использовании флюоресцентного и УФ-детекторов.

В литературе описано много различных методов очистки воды. Для удаления минеральных солей, видимо, наилучшим является деионизация на ионообменниках с последующей перегонкой в кварцевой посуде. Удовлетворительная очистка от органических загрязнений достигается фильтрацией деионизированной воды через активированный уголь.

Для высшей степени очистки воду пропускают через колонку с обращенно-фазным сорбентом, которую потом регенерируют промывкой метанолом, ацетонитрилом или тетрагидрофураном. Очень эффективным является также жесткое УФ-облучение.

В обращенно-фазной хроматографии воду обычно используют в виде смесей с полярными органическими растворителями. Поэтому практически важно знать об особом свойстве таких смесей — аномально высокой вязкости.

Таблица 6.2. Максимальная вязкость органических растворителей с водой

Органический компонент	$\eta_{20}, (m^2/c)10^5$	Содержание органического компонента в смеси с водой, % (об).	$\eta_{20}, (m^2/c)10^5$
Ацетон	0,32	10	1,2

Ацетонитрил	0,38	10	1.1
Этанол	1,20	40	2,8
Метанол	0,60	40	1.8

Таблица 6.3. Вязкость водно-органических смесей

Содержание органического компонента в смеси с водой, % (об)	η_{25} смеси, $(\text{м}^2 \cdot \text{с})10^5$	
	метанол	ацетонитрил
0	0,89	0,89
20	1,26	0,91
40	1,42	0,98
60	1,40	0,76
80	1,01	0,58
100	0,57	0,34

В табл.6.2 приведены составы водно-органических смесей, которым соответствует максимальная вязкость при 20 °С, а в табл. 6.3 — значения вязкости смесей воды с метанолом и ацетонитрилом в широком диапазоне концентрации при 25 °С.

Данные таблиц показывают, что вязкость водно-органических смесей при определенных концентрациях существенно выше, чем у индивидуальных компонентов. Это явление приводит к возрастанию сопротивления колонки и соответствующему повышению давления на ее входе, а также ухудшает разделение за счет снижения коэффициента диффузии.

ГЛАВА 7

ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ПОДБОРА УСЛОВИЙ РАЗДЕЛЕНИЯ

Перед начинающим хроматографистом проблема выбора типа разделительной системы (эксклюзионной, ион-парной, адсорбционной или другой) и подбора условий, с которыми лучше эту систему использовать для анализа необходимой ему смеси веществ, встает сразу же после того, как он получает эту смесь. Решить этот вопрос тем более сложно, чем менее известно вещество или вещества, с которыми предстоит работать, чем сложнее по составу проба, чем меньше опыт у хроматографиста и его возможность воспроизвести методику, описанную в литературе (отсутствие необходимых колонок и сорбентов, растворителей высокого качества, детектора, градиента растворителя и т.п.). Много зависит от того, располагает ли хроматографист такими-то чистыми стандартами, оборудованием и методиками для очистки сложных по составу проб, особенно медицинских и биологических, от мешающих анализу примесей (взвесей, полимерных веществ, солей и др.).

Как правило, надо стремиться подбирать условия разделения по принципу — от простого к сложному.

Если вещество, с которым предстоит работать, не является уникальным (они встречаются достаточно редко), прежде всего следует собрать о нем всю возможную информацию: к какому классу веществ относится, какова его формула, молекулярная масса, какие есть функциональные группы, в чем растворяется, какова температура кипе-

ния, показатель преломления, УФ-спектр, растворимость в различных растворителях и другое.

Когда информация о веществе или веществах собрана, следует провести тщательный литературный поиск с использованием реферативных журналов, оригинальной литературы, картотек, каталогов и собрать всю информацию о методиках анализа этого вещества как ВЭЖХ, так и родственными методами (ГЖХ, ТСХ, колоночной хроматографией). Попутно необходимо собрать информацию о методах очистки и подготовки проб. Собранную информацию следует заносить на карточки и хранить в картотеке. Если информация о веществе очень скудна или же полностью отсутствует, следует собирать информацию о наиболее близких по свойствам классах веществ. Когда весь собранный литературный материал обработан и систематизирован, нужно выбрать ту из методик, которая наиболее соответствует имеющемуся оборудованию, наиболее проста для исполнения и для воспроизведения которой есть все условия (колонки, сорбенты, растворители, реагенты).

Начинать следует с подготовки хроматографической системы. Ее следует тщательно проверить, приготовить нужный растворитель, промыть, уравновесить колонку с новым растворителем. Если возможно, после этого ввести тестовую смесь, чтобы убедиться в том, что колонка и вся система в целом наводятся в рабочее состояние. Уравновешивание колонки с растворителем следует проводить до тех пор, пока параметры удерживания тест-веществ не станут совершенно стабильными. Затем следует перейти к анализу. На начальном этапе работы не следует увлекаться высокой чувствительностью детектирования, за исключением только тех случаев, когда исследователь не располагает чистыми стандартами и вынужден сразу работать с образцами, чистота которых вызывает сомнение. Однако и в этих случаях лучше провести очистку до ВЭЖХ, использовав метод ТСХ или другой.

Установив на детекторе среднюю чувствительность, следует по одному ввести в инжектор растворы всех имеющихся и представляющих интерес чистых веществ (стандартов), фиксируя каждый раз время выхода, форму пика, наличие примесей и все отклонения от нормы, которые замечены. Если полученные результаты близки к тем, которые получены в методике, взятой в литературе, порядок выхода пиков тот же и форма их правильная, следует проанализировать наиболее чистую из проб, с которыми предполагается работать. Если в дальнейшем предполагается работать с загрязненными пробами, очистка которых затруднена или невозможна, нужно защитить колонку от возможного загрязнения и выхода из строя путем установки после инжектора предколонки. Следует учитывать, что предколонка, заполненная пелликулярным материалом, имеет малую емкость по загрязнениям, тогда как заполненная микрочастицами размером 5 или 10 мкм—существенно большую. Установка предколонки, заполненной микрочастицами, изменяет время удерживания веществ пробы, поэтому при ее установке следует повторить ввод чистых стандартов и идентификацию компонентов в пробе.

Если все вещества, которые вас интересуют, выходят достаточно быстро и с хорошим разрешением, можно переходить к калибровке по искусственным смесям и начинать количественную работу. Если же выходят не все вещества, следует попытаться добиться их элюирования, увеличив силу растворителя. Полезно, если есть возможность, для сокращения объема поиска использовать градиент растворителя от слабого до наиболее сильного. При этом не следует забывать два положения: во-первых, колонка должна быть промыта от тяжелых компонентов предыдущих проб, анализирувавшихся изократически, сильным растворителем; во-вторых, всегда следует проверить отсутствие ложных пиков при градиенте, введя вместо пробы чистый растворитель. Если исследователь не располагает возможностью применить градиент, следует использовать метод поиска от самого сильного растворителя к слабому.

При использовании для анализа обращенно-фазного варианта работы, подайте на колонку наиболее сильный растворитель, например метанол, уравновесьте с ним колонку (и вымойте все остатки от предыдущих проб, анализирувавшихся с более слабым растворителем). Затем введите пробу (еще лучше, стандарт), наиболее трудно

элюирующуюся. Если компонент элюируется слишком быстро (например, с нулевым объемом), значит, растворитель слишком сильный. Уравновесьте колонку с более слабым растворителем (например, метанол — вода в соотношении 80:20) и повторите ввод пробы. Если результат тот же, переходите последовательно к соотношениям 60:40, 40:60, 20:80 до тех пор, пока не будет получено разделение достаточно хорошее с приемлемым временем элюирования всей пробы (k' последнего элюирующегося компонента не должно превышать 10). Если при этом полученная селективность (разделение некоторых компонентов) вас не удовлетворяет, можно испытать систему ацетонитрил — вода (с несколько меньшим содержанием ацетонитрила по сравнению с системой метанол—вода, в которой получено приемлемое время элюирования) — ее селективность несколько другая. Наконец, можно испытать и систему тетрагидрофуран—вода (со значительно меньшим содержанием тетрагидрофурана по сравнению с системой метанол—вода), хотя она значительно менее удобна (хуже работает в ближней УФ-области, более склонна к окислению). Наконец, имея селективность по всем трем системам обращенно-фазных растворителей, можно определить состав трехкомпонентного (или даже четырехкомпонентного) растворителя, обеспечивающий наилучшее разделение всех компонентов. Этим, однако, на практике пользуются редко, довольствуясь обычно двухкомпонентным растворителем наилучшей селективности.

При работе в нормально-фазном режиме с привитой фазой или в адсорбционном варианте уравновесьте колонку с более сильным растворителем, например с системой гексан—изопропанол в соотношении 100:10. Так же, как и в предыдущем случае, вводите пробу при этом составе растворителя; далее повторяйте несколько раз, каждый раз уменьшая элюирующую силу растворителя (ряд соотношений гексан — изопропанол 100:3, 100:1, 100:0,3 и 100:0,1 и т.д.) до тех пор, пока не будет достигнуто разделение с k' для последнего элюирующегося компонента 8—10. Если полученная при этом селективность вас не удовлетворяет, можно попытаться повторить эту работу, заменив модификатор на другой (например, ацетонитрил, метиленхлорид, уксусную кислоту и т.д.). При этом селективность естественно, будет меняться. Можно также попытаться сменить привитую фазу на другую, оставив прежним модификатор, и за счет этого добиться требуемой селективности.

При работе в ионообменном режиме подбор условия осуществляют аналогично, начиная с наиболее сильного буферного раствора и последовательно идя к более слабому. Селективность и элюирующую силу при этом можно менять, изменяя pH буферного раствора, вводя большие или меньшие количества модификатора—органического растворителя (метанола, ацетонитрила и др.) или заменяя один буферный раствор на другой.

В случае использования ион-парной хроматографии выбор условий включает те же факторы, которые используют в ионообменной хроматографии. Однако дополнительно селективность можно регулировать, добиваясь нужного разделения, путем увеличения или уменьшения концентрации ион-парного реагента, а также изменяя соотношение полярной и неполярной групп в молекуле ион-парного реагента.

При анализе проб или компонентов, относительно которых в литературе нет данных, а информация об их свойствах очень скудна или отсутствует, можно попытаться применить подходы к разработке метода, которые описаны в разд. 11.3.

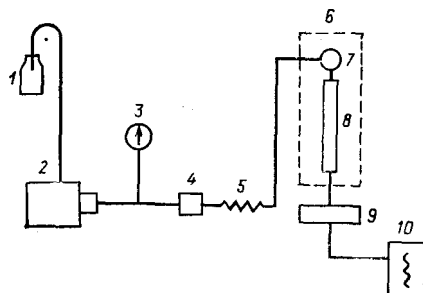
ГЛАВА 8

АППАРАТУРА ДЛЯ ВЭЖХ

В современной жидкостной хроматографии используют приборы самой различной степени сложности — от наиболее простых систем, собранных из минимально необходимого количества блоков, до комплектных хроматографов, снабженных мини-компьютерами, которые контролируют заданные рабочие пара-метры, формируют

градиент подвижной фазы, управляют различными дополнительными устройствами (автоматический ввод 1-пробы, коллектор фракций и др.) и проводят обработку полученных данных. Комплектные приборы с высокой степенью автоматизации обычно обеспечивают высокую производительность и точность результатов, что особенно важно в производственных условиях для контроля качества продукции. Однако самостоятельная сборка хроматографа из отдельных блоков дает возможность легко модифицировать прибор в зависимости от поставленной задачи и более эффективно использовать имеющееся оборудование.

Рис. 8.1. Принципиальная схема жидкостного хроматографа:



1 — сосуд для подвижной фазы; 2 — насос; 3 — манометр; 4 — фильтр; 5 — демпфер; 6 — термостат; 7 — инжектор; 8 — колонка; 9 — детектор; 10 — самописец

На рис. 8.1 представлена принципиальная схема современного жидкостного хроматографа. При необходимости этот прибор может быть снабжен различными дополнительными устройствами.

Характеристика отдельных компонентов прибора рассмотрена в данной главе, а принципы их соединения — в разд. 11.1.

8.1. НАСОСЫ

Современные насосы для жидкостной хроматографии представляют собой прецизионные устройства, обеспечивающие постоянную подачу растворителя в колонку и способные создавать давления до нескольких десятков мегапаскалей. Производительность насосов находится в диапазоне от 1 мкл/мин (микроколоночная и капиллярная хроматография) до 25—100 мл/мин (препаративная хроматография).

Насосы для ВЭЖХ должны удовлетворять следующим основным требованиям.

1. Химическая инертность материалов по отношению к подвижной фазе. Металлические детали насоса, контактирующие с подвижной фазой, обычно изготавливают из нержавеющей стали, а уплотнения — из высокоинертных нерастворимых материалов (как правило, на основе фторопласта или полиимидов). Нержавеющая сталь не является полностью инертным материалом и корродирует под действием сильных оснований, некоторых солей и слабой хлороводородной кислоты, которая часто присутствует в виде примеси в галогеносодержащих растворителях. Для особых случаев эти детали изготавливают из более стойких материалов — титана, специальных сплавов или керамики. Некоторые уплотнения разрушаются под действием отдельных растворителей (чаще всего хлорированных углеводородов), поэтому необходимо строго соблюдать рекомендации, изложенные в инструкции к насосу.

2. Достаточно высокое рабочее давление. Необходимое рабочее давление определяется сопротивлением используемых колонок и скоростью потока и может колебаться в весьма широких пределах. Можно считать, что давление 15—20 МПа достаточно для решения большинства аналитических задач. Однако лучше иметь насос с полутора—двукратным запасом по давлению, так как при этом существенно облегчаются условия его работы,

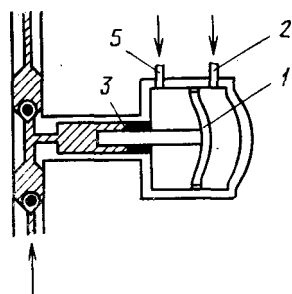
особенно уплотнений и клапанов. В данном случае стабильность потока подвижной фазы будет сохраняться значительно дольше, чем у насоса, работающего при давлениях, близких к предельным.

3. Высокая стабильность скорости потока. Точность поддержания скорости потока в колонке во многом определяет результаты как качественного, так и количественного анализа. Для основных вариантов ВЭЖХ нестабильность потока не должна превышать 0,5—1%. В эксклюзионной хроматографии при анализе молекулярно-массового распределения полимеров требования еще выше—0,1—0,3%. Кроме того, весьма желательно, чтобы насос не давал пульсации потока и имел малый рабочий объем для быстрой смены растворителя в режиме градиентного элюирования.

Все насосы для ВЭЖХ делятся на две группы: постоянного расхода и постоянного давления. Главными достоинствами насосов постоянного давления являются высокая производительность и отсутствие пульсации. Наиболее совершенной конструкцией насосов этого типа является насос с пневмоусилителем, принципиальное устройство которого показано на рис. 8.2. Поршень 1 большого диаметра, приводимый в действие газом, поступающим по штуцеру 2, связан с поршнем 3 меньшего диаметра, который через систему клапанов 4 осуществляет подачу жидкости из резервуара в колонку. Для быстрого перезаполнения насоса обратный ход поршня происходит под действием давления газа, поступающего через штуцер 5. Максимальное давление, развиваемое таким насосом, зависит от отношения площадей поршней и входного давления газа. В известном насосе фирмы «Хаскел», используемом для упаковки колонок, оно достигает 100 МПа.

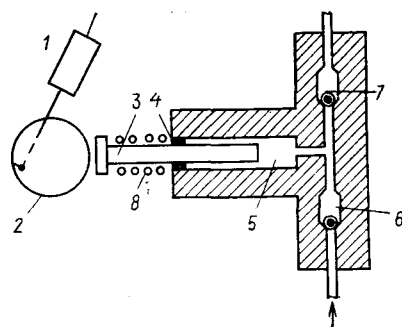
Основной недостаток насосов постоянного давления — изменение расхода подвижной фазы при изменении сопротивления системы. Сопротивление колонки может повыситься из-за загрязнения входного фильтра, насадки или предколоночного фильтра. Оно меняется с изменением вязкости растворителя, происходящим при колебаниях температуры и практически всегда наблюдающимся при градиентном элюировании. Поэтому насосы данного типа постепенно вытесняются насосами постоянного расхода и применяются, главным образом, в препаративной хроматографии и для набивки колонок.

Рис. 8.2. Схема насоса постоянного давления:



1—поршень воздушного цилиндра; 2, 5 — штуцеры подачи воздуха;
3 — поршень насоса; 4 — клапаны

Рис. 8.3. Схема поршневого насоса постоянного расхода:



1 — электродвигатель; 2 — эксцентрик; 3 — поршень; 4 — уплотнение; 5 — цилиндр; 6 — входной клапан; 7 — выходной клапан; 8 — возвратная пружина

Насосы постоянного расхода разделяются на две основные группы: шприцевые и возвратно-поступательные. Шприцевые насосы, как следует из их названия, по конструкции представляют собой шприц достаточно большой вместимости, в котором электродвигатель через силовую передачу перемещает поршень, выдавливающий растворитель с постоянной скоростью. После прохождения всего рабочего объема шприца поток прерывается для перезаполнения поршня. Из-за этого недостатка и сложности изготовления уплотнений большого диаметра шприцевые насосы средней производительности (до 5—10 мл/мин) практически вышли из употребления. Однако в связи с быстрым развитием микроколонной хроматографии, в которой расход подвижной фазы сравнительно невелик, конструкторы насосов вновь возвращаются к этой системе, важными достоинствами которой являются высокая точность, беспульсационная подача растворителя и отсутствие клапанов. Видимо, в ближайшем будущем можно ожидать значительного увеличения выпуска шприцевых насосов малой производительности.

Возвратно-поступательные насосы используют в ВЭЖХ наиболее широко, так как они удовлетворяют большинству требований. Практически единственный их принципиальный недостаток — пульсация потока, для сглаживания которой применяют специальные демпфирующие устройства, описанные ниже. Менее существенны недостатки — нарушение нормальной работы клапанов за счет их загрязнения механическими примесями в подвижной фазе и образование паровых пробок во время такта всасывания при работе с растворителями, имеющими высокое давление паров (пентан, метилхлорид и др.). Данные насосы выпускают двух типов: поршневые, или плунжерные, и мембранные, или диафрагменные. В обоих случаях прокачивание растворителя происходит за счет возвратно-поступательного движения поршня или мембраны в полости, ограниченной шариковыми клапанами.

В мембранных насосах поршень перемещается в полости с маслом, вызывая знакопеременные изгибы мембраны, укрепленной на другой стороне полости. Достоинством данных насосов является отсутствие контакта растворителя с уплотнением поршня. При этом существенно снижаются требования к материалу уплотнения поршня, а продукты его эрозии не могут засорить клапаны насоса.

Изменение производительности насоса осуществляется либо изменением рабочего объема цилиндра (посредством ограничения хода поршня), либо изменением частоты перемещения поршня. Второй способ обеспечивает более точную подачу растворителя, особенно при низких расходах.

Принципиальная схема наиболее простого поршневого насоса с одной головкой и постоянной частотой хода поршня, обеспечивающего синусоидальную характеристику подачи растворителя, показана на рис. 8.3. Электродвигатель 1 через эксцентрик 2 приводит в движение поршень 3, который через уплотнение 4 входит в цилиндр 5 с входным 6 и выходным 7 шариковыми клапанами. В фазе нагнетания клапан 6

закрывается, а клапан 7 открывается, и растворитель подается в колонку. Возвратная пружина 8 при соответствующем положении эксцентрика 2 возвращает поршень назад: при этом в цилиндре 5 возникает разрежение, клапан 7 закрывается, а клапан 6 открывается, и в цилиндр засасывается новая порция растворителя.

В насосах с обычной круглой формой эксцентрика продолжительность тактов всасывания и нагнетания одинакова, что приводит к достаточно высокому уровню пульсации потока. Конструкторам удалось заметно снизить пульсацию за счет использования эксцентриков специально рассчитанной сложной формы, которые обеспечивают резкое сокращение протяженности такта всасывания. При окончании такта нагнетания происходит быстрее перезаполнение насоса и сразу же начинается новый цикл. Высокая стабильность потока достигнута также при существенном уменьшении рабочего объема насоса с одновременным увеличением частоты движения поршня (до 50 Гц). В этом случае растворитель подается маленькими порциями быстро следующими друг за другом.

Недостатком описанных систем является повышенная склонность к образованию паровых пробок при работе с легкокипящими растворителями, поэтому в некоторых конструкциях введено специальное регулирование продолжительности перезаполнения насоса.

Очень часто для снижения пульсации используют насосы с двумя и даже с тремя головками и различные системы электронного регулирования. Уровень пульсации у простого насоса с одной головкой составляет около 9%; применение двух головок, работающих в противофазе, снижает его примерно до 3%. Наиболее сложные насосы с тремя головками и специально рассчитанной формой кулачка при малом рабочем объеме обеспечивают подачу растворителя почти без пульсации с неравномерностью не более 0,2%. По последним данным, применение схем электронного регулирования с обратной связью позволяет снизить эту величину вдвое.

При давлениях выше 10—15 МПа начинает проявляться сжимаемость некоторых растворителей, что приводит к уменьшению скорости потока. Поэтому многие насосы снабжают специальными системами поправки на сжимаемость подвижной фазы.

Достоинством поршневых насосов является возможность легко изменять производительность за счет использования сменных головок с иным диаметром поршня. Смена головки занимает не более нескольких минут. К многим моделям насосов выпускаются сменные головки для препаративной хроматографии с производительностью до 25—50 мл/мин, а некоторые конструкции имеют до трех сменных головок.

Большинство современных насосов снабжено указателями и ограничителями нижнего и верхнего пределов рабочего давления. Давление в хроматографической системе является исключительно важным параметром, и его необходимо контролировать. Для этой цели обычно используют указатель давления с проточными тензодатчиками. Объем датчиков очень мал, поэтому не возникает затруднений при замене растворителя в градиентном элюировании. Ограничители давления автоматически отключают насос при выходе давления из установленного диапазона, что существенно повышает безопасность работы. Ограничитель верхнего предела также очень полезен для предотвращения порчи колонок с некоторыми сорбентами, которые могут разрушиться при превышении допустимого для них рабочего давления.

Одним из последних достижений является новая конструкция насосной системы, разработанная фирмой «Хьюлетт Пакард» (США) для жидкостного хроматографа модели 1090. В этой весьма сложной системе разделены функции точного дозирования жидкости и создания необходимого давления, что в частности, устраняет влияние сжимаемости жидкости на точность подачи. Блок дозирования представляет собой сдвоенный шприцевой насос с вместимостью каждого шприца 110 мкл, с шаговым электродвигателем и переключающим клапаном. Когда один шприц подает растворитель, другой заполняется. Объем, соответствующий одному «шагу» электродвигателя, составляет 7 нл. В конце цикла направление хода поршней меняется и одновременно срабатывает быстродействующий клапан, переключающий направление потоков

жидкости. Процесс переключения занимает всего 50 мс. Давление, создаваемое шприцевым насосом, не превышает 0,6 МПа. В приборе могут быть установлены три таких блока, что позволяет работать в режиме градиентного элюирования с тремя растворителями. Из блоков дозирования, управляемых микропроцессором, растворители поступают в смеситель вместимостью 9 мкл, затем в диафрагменный насос, работающий с частотой 10 Гц по обычной схеме и создающий давление до 44 МПа, и далее в демпфер малого объема.

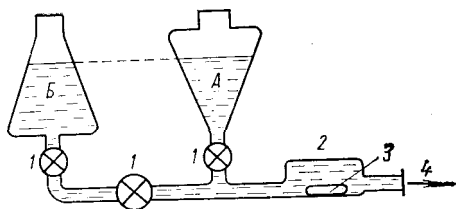
В описанной системе достигнуты поистине уникальные характеристики: при скорости потока от 1 мкл/мин до 5 мл/мин нестабильность потока составляет менее 1%, а воспроизводимость результатов в режиме градиентного элюирования лучше 1%. Такие параметры позволяют успешно работать с колонками любых типов, применяемыми в аналитической ВЭЖХ.

Разнообразие конструктивных решений, направленных на стабилизацию расхода растворителя, привело к тому, что ассортимент возвратно-поступательных насосов, выпускаемых различными фирмами мира, весьма широк. В то же время не существует насоса, имеющего наивысшие эксплуатационные характеристики для всех возможных областей применения. Хотя наиболее сложные и дорогие модели, естественно, дают наилучшие результаты, но для их эксплуатации требуется, высокая квалификация оператора и обслуживающего персонала. Так, в насосе с тремя головками вероятность засорения клапана значительно выше, а отыскать засоренный клапан гораздо труднее, чем в насосе с одной головкой. Поэтому такие насосы следует применять только при необходимости наивысшей точности подачи растворителя, например в эксклюзионной хроматографии полимеров. Можно считать, что в большинстве вариантов ВЭЖХ вполне удовлетворительную работу обеспечит насос с двумя головками, оптимизированной формой эксцентрика и регулированием расхода путем изменения частоты ходов поршня.

8.2. УСТРОЙСТВА ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ ГРАДИЕНТА

Назначение устройства для формирования градиента—изменять в ходе анализа состав растворителя таким образом, чтобы его элюирующая сила постоянно увеличивалась в соответствии с выбранным законом. Это должно обеспечить элюирование из колонки как слабо, так и сильно удерживающихся веществ с хорошим разделением в виде узких пиков правильной формы и за относительно короткое время анализа. Устройства для формирования градиента могут быть простыми по конструкции или сложными в зависимости от того, какой вид градиента требуется, как часто он используется, какой насос имеется в наличии и т.д.

Рис. 8.4. Схема устройства для создания градиента низкого давления с двумя сообщающимися сосудами и кранами:



1 — кран; 2 — камера смешения; 3 — магнитная мешалка; 4 — к насосу;
А и Б — слабый и сильный растворители

Простейший вид градиента—ступенчатый, для его осуществления на вход насоса устанавливают многоходовой кран, которым последовательно подают в насос растворители от самого слабого до самого сильного, через выбираемые исследователем

интервалы времени, поворачивая кран. Такой вид градиента может быть легко автоматизирован, если к крану добавить поворачивающее его устройство и соединить его с таймером. Недостаток ступенчатого градиента — резкие отклонения нулевой линии детекторов, когда до кюветы доходит граница нового растворителя, а также трудность проведения количественного анализа. Близким к такому ступенчатому градиенту является используемый в хроматографе «Милихром». Он формируется в насосе по принципу «коктейля», несмешиваемые слои заранее приготовленных растворов разной элюирующей силы последовательно набирают в шприц насоса от самого сильного до самого слабого. В шприце насоса формируется таким образом многоступенчатый градиент. Объем каждого слоя и его элюирующая сила подбираются исследователем экспериментально, на каждый новый анализ градиент набирается снова. При наборе слоев в шприц и при их подаче в колонку границы слоев размываются, это уменьшает резкость ступенек градиента и приближает его к градиенту с плавным профилем.

Одно из простых устройств для создания плавного градиента изображено на рис. 8.4. Оно представляет собой систему с двумя сообщающимися сосудами конической формы. Когда все-краны открыты, уровни в сосудах с растворителями А и Б одинаковы. По мере расходования растворителей в насос будет попадать смесь, содержащая все больше растворителя Б и все меньше—растворителя А. Меняя форму сосудов, их объем и подачу насоса, можно получить градиенты разной формы.

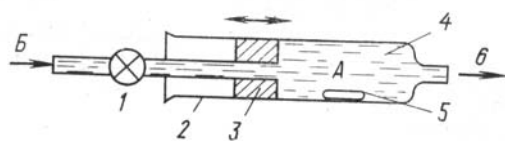
Экспоненциальные градиенты можно получить с использованием приспособления, сделанного из шприца (рис. 8.5). В шприц набирают определенный объем слабого растворителя А. Этот объем можно менять, передвигая поршень шприца. Если включить подачу насоса, сначала на колонку будет подаваться растворитель А, который затем будет по экспоненциальному закону смешиваться с более сильным растворителем Б. Форму получаемого градиента можно менять, подбирая концентрации растворов А и Б, вместимость камеры шприца и скорость подачи растворителя насосом. Рассчитанное на высокое давление устройство аналогичной конструкции может быть установлено между насосом и инжектором. Оно также позволяет получить экспоненциальный градиент. Его преимущество — возможность создания градиента для микроколонок с одним насосом, так как при этом вместимость насоса и подводных трубок не искажает и не задерживает начала градиента.

Недостаток приведенных устройств для формирования градиента — сложность работы с ними, низкая воспроизводимость, трудность подготовки многих смесей растворителей, невозможность точного формирования градиента заданной формы, а ценность в том, что в затруднительных случаях с помощью относительно несложных самодельных устройств удается решить задачи, принципиально нерешаемые изократически.

Устройство для формирования градиента произвольной формы делятся на две большие группы: устройства формирования градиента при низком давлении (на входе в насос) и при высоком давлении (на выходе из двух или более насосов). Обе группы имеют преимущества и недостатки. Появление и развитие новых приспособлений, методов работы и вариантов ВЭЖХ позволило уменьшить недостатки обоих вариантов устройств формирования градиента и не дало окончательного преимущества ни тому, ни другому.

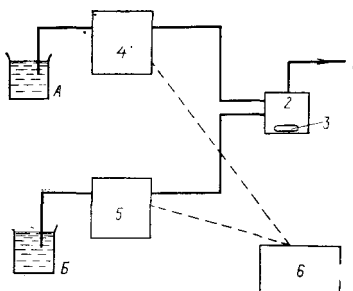
Система формирования градиента при высоком давлении изображена на рис. 8.6 (часть системы до инжектора). Как видно из рисунка, программатор 6 управляет шаговыми двигателями насосов, подающими растворители А и Б в постоянно меняющемся по выбранному исследователем закону соотношении. Растворители поступают в динамический (иногда статический, менее эффективный) смеситель с магнитной мешалкой, смешиваются и подаются на инжектор и колонку. Как видно из схемы, по сравнению с изократической система усложняется и, следовательно, стоит дороже: добавляются второй насос, программатор и смеситель, ряд электрических и гидравлических линий. Если потребуется градиент из трех или четырех растворителей, то для этой схемы будут необходимы дополнительно еще 1 или 2 насоса.

Рис. 8.5. Схема устройства для создания градиента низкого давления с использованием шприца:



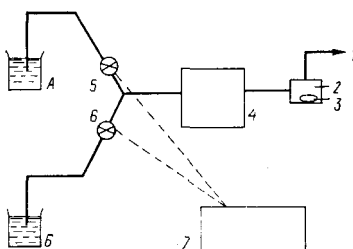
1 — кран; 2 — шприц; 3 — поршень шприца; 4 — камера смешения; 5 — магнитная мешалка; 6 — к насосу; А и Б — слабый и сильный растворители

Рис. 8.6. Схема устройства для создания градиента высокого давления:



1 — к инжектору; 2 — смеситель; 3 — магнитная мешалка; 4 — насос для подачи растворителя А; 5 — насос для подачи растворителя Б; 6 — программатор; А и Б — слабый и сильный растворители

Рис. 8.7. Схема устройства с клапанами для создания градиента низкого давления:



1 — к инжектору; 2 — смеситель; 3 — магнитная мешалка; 4 — насос; 5,6 — клапаны; 7 — программатор; А и Б — слабый и сильный растворители

Схема формирования градиента при низком давлении представлена на рис. 8.7. Управление градиентом также возложено на программатор, однако управляет он не насосом, а двумя электромагнитными клапанами, открывая или закрывая тот или другой по заданной программе. Этим обеспечивается поступление на вход насоса 4 смеси растворителей А и Б в заданном соотношении. Смесь перемешивается в клапанной системе, подводящих линиях, поршневых камерах и окончательно становится однородной в смесителе.

На первый взгляд кажется, что система эта проще и лучше предыдущей: клапанная система стоит, очевидно, дешевле дополнительного насоса. Однако клапанная система, работающая при некотором разрежении, из-за сложной геометрии и в условиях смешивания при этом двух растворителей, содержащих растворенные газы, при обычной дегазации работает с постоянными отказами. Образовавшиеся при смешивании пузырьки

налипают в клапанах и поршневых камерах, насос перестает подавать растворитель. Это особенно характерно для обращенно-фазных и буферных растворов, широко применяющихся в ВЭЖХ. Сложно не только провести глубокую дегазацию, но и предохранять дегазированные растворители от контакта с воздухом, приводящему к растворению газов.

Стоимость сложных дегазирующих устройств в сумме со стоимостью клапанной системы примерно уравнивают цену приборов, работающих с градиентом высокого и низкого давления. Однако если у исследователя возникает необходимость в градиенте из трех или четырех растворителей, прибор с градиентом низкого давления при прочих равных условиях окажется дешевле.

Таким образом, суммируя преимущества и недостатки устройств для создания градиента высокого и низкого давления, можно сделать следующие выводы.

Устройство для создания градиента высокого давления продето и стабильно в работе, не требует особой дегазации растворителей, легко перестраивается для препаративной, полумикро- и микроколоночной работы. Оно может работать с относительно дешевыми насосами с шаговым двигателем и одним плунжером, работающими по циклу: медленная подача — быстрое перезаполнение. Оно может иметь встроенные в насосные линии и не вызывающие особых проблем непроточные манометры, демпферы большого объема, колонки со специальными сорбентами, «полирующими» один или оба растворителя, — все это не сказывается на воспроизводимости и точности градиента.

Устройство для создания градиента низкого давления должно обязательно иметь надежную систему глубокой дегазации, без которой стабильная работа невозможна. Это может быть или система дегазации продувкой растворителей непрерывным током гелия в процессе работы (большой ток вначале, и медленный для поддержания дегазированного состояния); расход гелия при этом значителен. Можно использовать систему динамической дегазации растворителей при их прохождении через полупроницаемые фторопластовые трубки из полимера особого сорта, находящиеся в вакууме; она стоит довольно дорого, но позволяет избежать расхода гелия и получить растворители, из которых удалено более 99% растворенных газов. Устройство для создания градиента низкого давления должно работать с насосами, всасывающими и подающими растворители; их невозможно использовать для микроколоночной и трудно — для препаративной работы большой производительности.

Программаторы градиента создаются, как правило, на базе персональных микро-ЭВМ с объемом памяти от 48 до 64 К. Запись программ градиента ведется на гибких дисках или же с использованием кассет и магнитофонов. При работе с более старыми моделями требуется ежедневный набор программ оператором. Если для создания градиента и управления им используют микро-ЭВМ с достаточно большим объемом памяти и возможностью гибкого программирования с использованием языка БЭЙСИК, часто эту же ЭВМ используют и для обработки полученных хроматограмм.

Смесители представляют собой камеру небольшой вместимости из нержавеющей стали с помещенной внутрь магнитной мешалкой, привод которой находится снаружи. Для однородности перемешивания в некоторых моделях используют двойную камеру с двумя магнитными мешалками от одного привода. Объем таких смесителей обычно составляет 1—1,5 мл. Если смешение осуществляется неэффективно, растворитель в колонку и далее в детектор поступает неомогенный. Это приводит к нарушению хроматографического процесса в колонке и заметно увеличивает шумы детектора. Если хроматографист забыл включить в сеть магнитную мешалку, неомогенность состава растворителя и шумы детектора достигают максимального значения.

Статические смесители, представляющие собой каналы сложной формы, предназначенные для смешения за счет столкновения потоков, менее эффективны. Для препаративной работы требуются смесители со значительно большей вместимостью, рассчитанные на работу с большими подачами растворителей. Для микроколоночной ВЭЖХ с градиентом растворителя необходим микросмеситель вместимостью менее 100 мкл; попытка использовать смеситель на 1—1,5 мл приводит к сильному искажению

формы градиента. Это легко понять, так как расход растворителя при работе с микроколонками диаметром 1 мм составляет 30 мкл/мин. Растворитель в большом смесителе будет заменен новым за 30—50 мин.

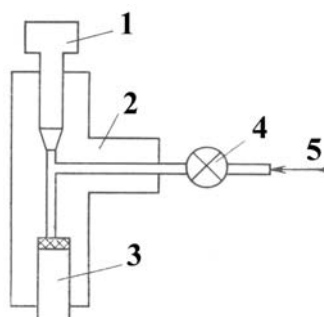
8.3. ИНЖЕКТОРЫ

Инжекторы для ввода пробы должны обеспечивать ввод проб от 0,1 мкл до нескольких миллилитров (соответственно в микро- и препаративных колонках) с высокой воспроизводимостью при давлениях до 30—50 МПа. Размывание пробы в инжекторе должно быть минимальным. Инжекторы должны работать при повышенных температурах и в среде активных растворителей и реагентов, при этом их уплотнения должны быть механически прочными.

Было предложено большое число конструкций инжекторов разных типов, многие из которых из-за сложности изготовления, и ненадежности работы, высокой стоимости не получили широкого распространения. Рассмотрим типы инжекторов, используемых в ВЭЖХ.

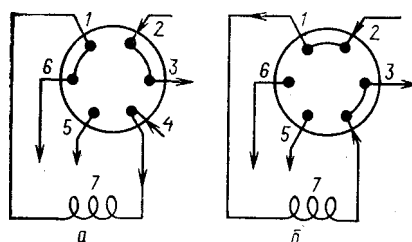
Простейшим является инжектор с остановкой потока («стоп флоу»). Он включает кран для перекрытия потока перед инжектором и тройник, к которому подсоединены колонка, подводящий растворитель капилляр и заглушка (рис. 8.8). Когда нужно ввести пробу, останавливают насос, перекрывают кран, отворачивают заглушку, набирают пробу в микрошприц, вводят иглу до рупора в фильтр колонки, наносят пробу, вынимают микрошприц, заворачивают заглушку, открывают кран и включают насос. Поток растворителя вымывает пробу в колонку. Инжектор прост по конструкции, легко может быть изготовлен самостоятельно. Недостатки: много ручных операций при работе, нестационарность потока растворителя дает ложный пик и затрудняет точные количественные измерения удерживания, эффективности и других параметров.

Рис. 8.8. Инжектор с остановкой потока растворителя:



1 — заглушка; 2 — корпус инжектора; 3 — колонка; 4 — кран для остановки потока; 5 — подача растворителя от насоса

Рис. 8.9. Схема работы петлевого инжектора:



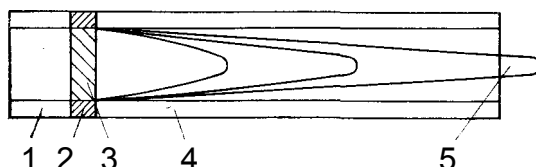
а — заполнение петли пробой; б — ввод пробы на колонку
1 — к петле; 2 — к насосу; 3 — к колонке; 4 — ввод пробы; 5, 6 — сброс избытка пробы; 7 — петля

Инжектор с резиновой мембраной по конструкции похож на предыдущий, в нем не используют кран остановки потока растворителя и на месте заглушки зажимается упругая резиновая мембрана. Ввод пробы осуществляют микрошприцем, рассчитанным на работу в герметичных условиях при высоких давлениях. Пробу вводят в поток растворителя без его остановки путем прокалывания мембраны, введения микрошприца до упора иглы в фильтр колонки и нанесения пробы. Инжектор прост по конструкции и легко может быть изготовлен. Основным недостатком — наличие резиновой мембраны, которая набухает в растворителях, теряет герметичность при многих проколах, выделяет в поток растворителя ингредиенты, дающие ложные пики и повышающие фон и шумы детектора. Частицы мембраны, выкрашивающиеся при проколах, загрязняют входной фильтр колонки, создают эффект «памяти». Выбор для мембраны марки резины, наиболее устойчивой к данному растворителю, использование мембран многослойных с наружными слоями из фтор-полимеров или из металлической фольги позволяет уменьшить, но не исключить эти недостатки. Микрошприцы высокого давления также дороги, более трудно промываются и менее надежны, чем обычные. Этот тип инжектора также используют в основном для учебных целей.

Наибольшее распространение имеют петлевые инжекторы (петлевые краны). Пробу вводят в петлю заданной вместимости при давлении, близком к атмосферному, с помощью микрошприца или шприца. Затем поворотом крана петля сообщается с линией подачи растворителя от насоса и входом колонки, проба вымывается из петли и попадает в колонку. Схема работы одного из петлевых инжекторов представлена на рис. 8.9. В положении «заполнение петли» поток растворителя от насоса идет непосредственно в колонку, а петля соединяется с линиями «сброс» и «ввод пробы» и находится при атмосферном давлении. В этом положении петля промывается чистым растворителем с помощью шприца вместимостью 2—5 мл от остатков предыдущей пробы, затем с помощью микрошприца в петлю вводится определенный объем пробы. Проба может вводиться либо с полным заполнением петли, либо с ее частичным заполнением. Первый способ является предпочтительным при количественном анализе и позволяет получить наиболее воспроизводимые результаты анализа. Он требует для полного заполнения петли подачи в нее объема пробы, в 5—6 раз превышающего вместимость петли. Это необходимо для полного вытеснения из петли растворителя пробой. Частичное заполнение петли удобнее, так как позволяет, не меняя петли вместимостью, например, 50 мкл, вводить пробы от 1 до 40 мкл. При этом объем пробы, попадающий в петлю, не должен превышать примерно $\frac{4}{5}$ вместимости петли. Так как объем пробы, попадающий в петлю в этом случае, не точно равен тому, который подан микрошприцем (так как часть пробы остается в подводящих каналах от конца микрошприца до начала петли), то точность количественного анализа в этом случае будет ниже, чем при полном заполнении петли.

Ясно представлять, что происходит при заполнении петли, очень важно для выбора наилучшего способа работы с инжектором того или иного типа. Почему при полном заполнении петли нужно вводить 4—5 объемов пробы? Почему при частичном заполнении нельзя вводить больше 80% от вместимости петли? Это связано с гидродинамикой заполнения петли и иллюстрируется рис. 8.10. Из схемы видно, что из-за трения у стенок петли остается исходный растворитель, а передний фронт приобретает форму «языка». Если при частичном заполнении петли подать объем, равный вместимости петли или близкий к нему, часть «языка» выйдет за пределы петли в слив и не попадет в колонку. Точно так же при полном заполнении петли, не вытеснив весь растворитель от стенок, невозможно получить воспроизводимых результатов анализа. В канале 3 остается часть пробы, которая не попадает в колонку при частичном заполнении петли. Ясно, что чем она меньше, тем лучше для работы. У инжекторов разной конструкции эта часть пробы может быть от нескольких десятых долей микролитра до 7 — 15 мкл.

Рис. 8.10. Схема размывания пробы при заполнении петли:



1 — игла микрошприца; 2—уплотнение иглы; 3 — канал с пробой, не попадающей в колонку; 4 — петля; 5 — «язык» фронта пробы

Петлевые инжекторы обычно могут работать при давлениях до 49—70 МПа, однако срок их службы значительно удлиняется, если прижим трущихся деталей уменьшается так, чтобы герметичность сохранялась до 35 МПа. Это разумно, так как очень редко работа проводится при давлениях выше 35 МПа. Если это все же нужно, то увеличить давление нажимных пружин можно очень быстро и просто за несколько минут.

Петлевые инжекторы делятся на имеющие внешнюю и внутреннюю петлю. Внешние петли представляют собой обычно куски капилляра определенной вместимости, которые можно легко заменить. Внутренние петли представляют собой каналы определенной вместимости, выполненные в теле инжектора. Как правило, вместимость внутренних петель мала (0,06—10 мкл), и инжекторы такого типа предназначаются для микроколоночной ВЭЖХ. Смена такой внутренней петли—это, как правило, достаточно сложная разборка с заменой узла инжектора на новый, имеющий другой объем канала. Поэтому для упрощения работы иногда такие инжекторы снабжают несколькими внутренними петлями, которые по желанию могут находиться в рабочей или запасной позиции. Есть инжекторы, которые могут перестраиваться от варианта работы с внутренней петлей к работе с внешней петлей. Некоторые инжекторы снабжаются устройствами для фильтрования вводимых образцов. Существуют пневматические или электрические приводы к инжекторам, позволяющие вводить пробу по команде от микропроцессора.

Приобретая инжектор, всегда следует внимательно ознакомиться с особенностями его конструкции: какой мертвый объем до петли, какое сечение каналов, при какой температуре и давлении инжектор может работать, какие петли можно с ним использовать. Учитывая, что выходят из строя пластмассовые детали уплотнения, нужно их приобрести заранее, так же как и конусные муфты, накидные гайки и капилляры для изготовления разных петель.

Кроме ручных инжекторов, существуют многочисленные конструкции полностью автоматических инжекторов, которые в соответствии с заданной программой могут вводить от 20 до 100 и более образцов. Они обеспечивают выполнение всех циклов ввода пробы: промывку петли, заполнение, ввод пробы автоматически. При этом последовательность анализа образцов и число вводов одной и той же пробы могут быть заданы. Они довольно дороги, как правило, требуют линии сжатого воздуха для работы и высококвалифицированного обслуживания. Поэтому их применение оправдано только в тех случаях, когда необходимо анализировать большое количество идентичных проб.

Наконец, следует упомянуть об инжекторах-насосах, способных по команде подать на колонку пробу определенного объема и остановиться. Их применение полностью оправдано, когда нужно многократно подавать на препаративную колонку воспроизводимо и без размывания один и тот же образец. С использованием такого насоса, управляемого микропроцессором коллектора фракций, можно легко собрать автоматическую препаративную изократическую систему, стоящую очень недорого.

8.4. ДЕТЕКТОРЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Детекторы для ВЭЖХ должны фиксировать изменение ка-сих-либо свойств растворителя, выходящего из колонки, связанное с наличием в нем анализируемых веществ. Это может быть изменение оптических свойств элюента (в ИК-, УФ- или видимой области), его показателя преломления, способности флюоресцировать, электропроводности, способности окисляться или восстанавливаться, диэлектрической проницаемости и т.д.

Детекторы подразделяются на селективные и универсальные. Селективные детекторы способны зафиксировать элюирование интересующих исследователя веществ, обладающих специфическими свойствами, на фоне многих других компонентов, такими свойствами не обладающих. Эти детекторы (флюоресцентный, электрохимический и др.) находят широкое применение в анализе следовых количеств лекарственных препаратов в биологических образцах, микропримесей, биогенных аминов. Универсальные детекторы должны реагировать на элюирование любых веществ вне зависимости от того, обладают они какими-то особыми свойствами или нет. Такие детекторы находят широкое применение в органической химии, нефтехимии, фармацевтической, химической, медицинской промышленности, биологических науках.

Какими же свойствами должен обладать идеальный детектор для ВЭЖХ? Он не должен вызывать размывания зоны пика, выходящего из колонки, и ее уширения. Должен иметь высокую чувствительность и отклик на прохождение вещества, который можно предсказать. Образец не должен разлагаться, проходя через детектор. Изменения температуры, скорости потока и состава растворителя не должны влиять на работоспособность детектора. Отклик детектора на количество вещества должен быть линейным, и линейный диапазон должен быть широким. Детектор должен быть простым и удобным в работе и обслуживании. Детектор при прохождении вещества должен давать не только количественную информацию, но и качественную, подтверждающую состав или строение вещества. Отклик детектора должен появляться при прохождении через кювету любого вещества, этот отклик не должен зависеть от растворителя, он должен быть быстрым.

Детекторы, используемые для ВЭЖХ, конечно, далеко не в полной мере обладают свойствами идеального детектора. Таких приближающихся по характеристикам к идеальным детекторам, как пламенно-ионизационный или по теплопроводности в газовой хроматографии, в ВЭЖХ нет. Однако имеющийся ассортимент детекторов позволяет выполнять многие интересные работы, причем этот ассортимент постоянно пополняется новыми разработками.

Какие же характеристики детекторов нужно принимать во внимание, подбирая подходящий для данной задачи детектор? Эти характеристики следует подразделять на те, которые связаны с самой конструкцией детектора, и на те, которые зависят от свойств растворителя, анализируемого вещества.

Каждый детектор характеризуется определенным шумом, который для разных типов детекторов выражается в разных единицах. Его обычно определяют производители детекторов условиях, когда он минимален. Чем меньше шум у детектора по сравнению с другим такого же типа, тем лучше использованные конструкционные элементы, более удачная схема, лучше регулировка. Разница в шуме у разных детекторов одного типа может составлять порядок и даже больше (по данным фирм-производителей).

Другая очень важная величина — это дрейф нулевой линии, который определяется смещением нулевой линии в процессе работы детектора за определенный отрезок времени после прогрева. Эта величина также может иметь разницу у детекторов одного типа более чем на порядок.

Вместимость кюветы детектора является фактором, наряду с ее геометрией (размывающей или неразмывающей), определяющим, насколько могут быть размыты пики, попадающие в нее из колонки. Вместимость кюветы должна быть не более 0,1 объема первого пика, который представляет интерес для исследователя (например, если

первый такой пик выходит в объеме 30 мкл, вместимость кюветы не должна превышать 3 мкл). Это особенно существенно для экспресс-анализов методом ВЭЖХ, выполняемых на коротких (3—5 см) колонках, заполненных сорбентом зернением 3 мкм. Важно это и для микро-люнок диаметром 2, 1 мм и менее.

Исказить пик может также недостаточное быстродействие детектора (этот недостаток наиболее часто встречается у детекторов старой разработки); если это так, то более ранние пики будут шире и ниже их реальной формы. Однако быстродействие более чем 0,1 с (кроме прямой стыковки детектора с ЭВМ) также бесполезно, ввиду того что быстродействие самописцев и интеграторов обычно составляет 0,3—0,4 с отклика на 90% шкалы. Нелишне отметить, что использование самописца с медленным откликом приводит к такому же эффекту.

Линейный динамический диапазон, характеризующий диапазон концентраций, в котором отклик детектора пропорционален концентрации, у детектора должен быть широким (желательно более 10^5), для того чтобы из одного анализа можно было определять как основные компоненты, так и примеси, содержащиеся в следовых количествах.

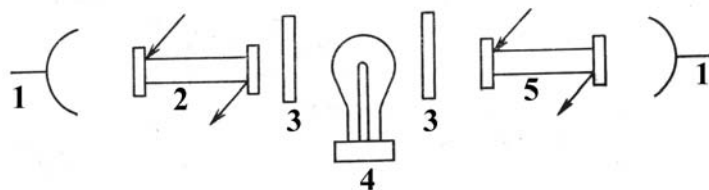
Наконец, если детектор работает в градиентном режиме или в условиях, не исключающих некоторого изменения окружающей температуры, очень большое значение имеет нечувствительность детектора к флуктуациям температуры, скорости потока и изменению состава растворителя и стабильность его отклика вне зависимости от изменения этих условий.

8.4.1. Фотометры для работы в ультрафиолетовом и видимом диапазонах

Фотометры, работающие в УФ-диапазоне, пожалуй, являются наиболее широко распространенными и популярными детекторами в ВЭЖХ. Это связано с их относительно низкой стоимостью, надежностью работы лампы (до 6000 ч и более), нечувствительностью к изменению температуры и состава растворителя.

Принципиальная схема простейшего УФ-фотометра представлена на рис. 8.11. Источником УФ-излучения в нем является ртутная лампа низкого или среднего давления, имеющая интенсивные линейчатые спектры, из которых лучи с определенной длиной волны вырезаются с помощью фильтров. Ртутная лампа низкого давления около 90% энергии излучает при 254 нм, что дает возможность исключить фильтры. Иногда с ее помощью возбуждают излучение фосфорного экрана при 280 нм, которое используют как вторую длину волны. Другие лампы в сочетании с фильтрами и (иногда) блоками питания позволяют работать при 206, 214, 229, 254, 280, 313, 334, 365 нм и более (т.е. в видимой области). Стоимость таких ламп, блоков питания к ним и фильтров определяет, имеет ли смысл использовать их или же перейти к спектрофотометрическому детектору. Большое значение имеет, конечно, срок службы таких ламп, который заметно различается от 300—500 ч (что близко к сроку службы дейтериевой лампы спектрофотометра) до 5000—6000 ч — этим также определяют преимущества перед спектрофотометром. Нередко стоимость такого «сложного» фотометрического детектора с полным набором фильтров, ламп, блоков питания не меньше, а больше стоимости спектрофотометрического детектора.

Рис. 8.11. Принципиальная схема УФ-фотометра с фильтрами:



1 — фотоприемник; 2 — рабочая микрокувета; 3 — фильтр;
4 — ртутная лампа; 5 — микрокувета сравнения

Следует отметить, что очень многие органические вещества достаточно интенсивно поглощают при 254 нм. Это все ароматические и полиароматические соединения, гетероциклические соединения, вещества, содержащие в своем составе гетероатомы, карбонильную группу и многие другие. Во всех этих случаях применение простейшего дешевого и надежного УФ-фотометра целиком оправдано. Чувствительность этого прибора достигла 0,001—0,0002 е.о.п. на всю шкалу, а характеристики по шумам и дрейфу заметно улучшились. Появились в продаже для них и полные комплекты кювет от микроколоночных (0,5 — 2 мкл) до препаративных (с длиной оптического пути 0,1 — 0,5 мм). Выпускаются УФ-фотометры, приближающиеся к спектрофотометрам. В них, в качестве источника излучения вмонтирована дейтериевая лампа с широким спектром от 190 до 360 нм, вместо дорогого монохроматора используют фильтр. Если набор нужных длин волн невелик, стоимость такого фотометра с набором фильтров заметно ниже, чем спектрофотометра.

8.4.2. Спектрофотометрические детекторы

Если в упрощенной схеме фотометра лампу заменить на такой источник излучения, который может излучать монохроматический свет любой требуемой длины волны без применения фильтров, это и будет схемой спектрофотометрического детектора для ВЭЖХ. Описания достаточно сложных оптических схем такого источника излучения можно найти в большинстве руководств по ВЭЖХ. С помощью таких схем из широкого, непрерывного спектра излучения дейтериевой лампы (190—360 нм) и лампы видимого света (длина волны более 360 нм) с использованием голографической решетки вырезается более или менее узкая полоса УФ- или видимого излучения. Это излучение и попадает в сравнительную и рабочую кюветы, которые далее работают по той же схеме, по которой устроен фотометр. Различия между разными конструкциями спектрофотометрических детекторов вызываются более или менее удачными оптическими схемами, более узким или широким пучком монохроматического света, лучшей или худшей воспроизводимостью «повторной установки той же длины волны. Различают также УФ-спектро-фотометрические детекторы, использующие в качестве источника излучения только дейтериевую лампу, и работающие в УФ-и видимом диапазонах — они дополнительно оснащаются лампой видимого света.

Характеристики разных спектрофотометров так же, как фотометров, могут заметно различаться по шумам, дрейфу нулевой линии, максимальной чувствительности — эта разница может составить более одного порядка. Особенно большая разница между старыми моделями менее удачной разработки, оптические и электронные блоки которых из-за длительной работы состарены и уже не обеспечивают паспортных характеристик, и новыми моделями последних разработок. Это следует учитывать, особенно в тех случаях, когда достижение максимально возможной чувствительности только и позволяет решить поставленную задачу. Если такая задача не ставится, нет смысла гнаться за рекордными показателями спектрофотометра, а лучше выбрать более дешевую модель, но в более полной комплектации.

Основная трудность при работе со спектрофотометрами — это относительно короткий срок службы довольно дорогих дейтериевых ламп. Он составляет обычно 300—700, редко 1000 ч, после чего шумы резко возрастают и лампу необходимо менять.

Если спектрофотометр предполагается установить и эксплуатировать в условиях атмосферы, содержащей пары органических веществ, воды, пыли (например, в производственных лабораториях), целесообразно приобрести спектрофотометр, чувствительная оптическая схема которого герметично защищена от вредного влияния загрязнений атмосферы. Этому же способствует регулярная замена осушителя, обычно силикагеля, помещаемого внутри спектрофотометра.

Необходимо укомплектовать спектрофотометр запасными дейтериевыми лампами, запасными кварцевыми окнами и прокладками для кюветы (прокладки часто одноразового использования), микроколоночной и препаративной кюветами, если такие режимы работы могут понадобиться.

Спектрофотометр по своим характеристикам приближается к универсальным и селективным детекторам (в зависимости от выбранной длины волны). При длинах волн, близких к 190 нм, он позволяет детектировать сахара, жиры, сложные и простые эфиры, ПАВ полиоксиэтиленгликолевого ряда и другие вещества, практически не поглощающие УФ-излучения при 210 нм и выше — здесь он приближается к универсальному детектору.

Некоторые спектрофотометры оснащены добавочными устройствами, которые позволяют записать (остановив поток растворителя в момент прохождения пика через кювету) ультрафиолетовый спектр пика, соответствующего данному веществу. Такая возможность часто представляется начинающим очень заманчивой. Однако следует учитывать, что УФ-спектр сам по себе не очень информативный. Можно поступить проще, собрав препаративно фракции, соответствующие интересующим пикам, и исследовать не только их УФ-спектры, но и другие физико-химические характеристики.

Существуют быстро сканирующие спектрофотометрические детекторы, которые позволяют снять УФ-спектр вещества при его прохождении через кювету без остановки потока. Один из наиболее удачных детекторов такого типа используют в хроматографе «Милихром», в котором с помощью зеркала, поворачивающегося по заданной программе на определенный угол с заданной частотой, кюветы с образцом и сравнительная кювета освещаются последовательно монохроматическими лучами с выбранными оператором различными длинами волн. Получаемая при этом хроматограмма, представляющая собой комбинацию из двух, трех или более хроматограмм, снятых при разных длинах волн, позволяет получить качественную информацию о возможных примесях, замаскированных в одном пике, о природе и структуре вещества, о длине волны, при которой поглощение данного вещества максимально и можно определить его минимальное количество. Эта информация часто позволяет по одной хроматограмме решить сразу несколько достаточно сложных задач: обнаружить примеси, установить чистоту веществ, определить длину волны, при которой поглощение каждого вещества наибольшее, провести идентификацию. Работать с таким детектором, конечно, сложнее, чем с простым спектрофотометром.

Существуют еще более усложненные спектрофотометры, например такие, которые позволяют, в соответствии с записанной программой, изменять длину волны для каждого пика или группы пиков таким образом, чтобы получить максимальную чувствительность. Длина волны при этом меняется автоматически несколько раз за время анализа.

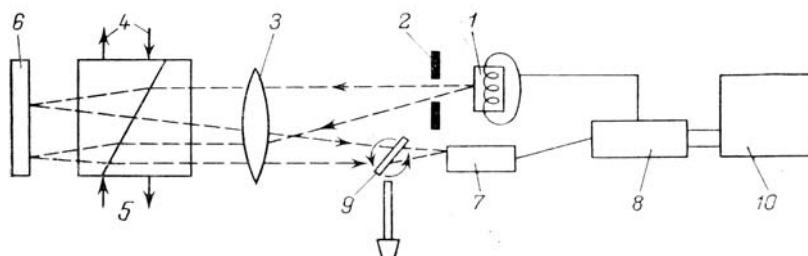
В заключение хотелось бы подчеркнуть два положения. Применению спектрофотометров как универсальных детекторов, работающих при длинах волн около 200 нм, в большой мере препятствует очень малый выбор растворителей, УФ-прозрачных в этом диапазоне. Только тщательно очищенные ацетонитрил и вода могут использоваться в обращенно-фазном варианте при 200 нм и ниже. Получить такие высокочистые растворители очень трудно, и стоят они дорого. Еще труднее очистить для работы в этой области алканы (гексан, гептан и др.).

8.4.3. Рефрактометрические детекторы

Дифференциальный рефрактометр непрерывно регистрирует изменение показателя преломления элюата на выходе из колонки. Главным достоинством этого детектора является универсальность, так как при выборе подходящего растворителя он может детектировать любые вещества. Поэтому он занимает второе место (после УФ-детектора) по частоте использования. К другим достоинствам рефрактометра относятся возможность работы с любыми растворителями в широком интервале скорости потока, невысокие требования к чистоте подвижной фазы, надежность и удобство в эксплуатации. Некоторые модели детекторов могут работать при температуре до 150 °С, что является исключительно важным для эксклюзионной хроматографии ряда синтетических полимеров.

Рефрактометр представляет собой недеструктивный концентрационный детектор средней чувствительности. Последняя определяется разностью показателей преломления элюента и анализируемых веществ и часто может быть повышена за счет правильного выбора подвижной фазы. В оптимальных условиях предел обнаружения для рефрактометра достигает $5 \cdot 10^{-7}$ г/мл. Основные недостатки рефрактометрических детекторов — практическая невозможность использования при градиентном элюировании и необходимость тщательной стабилизации температуры. Для работы на максимальной чувствительности нужно поддерживать температуру элюента и обеих ячеек кюветы с точностью до 10^{-3} - 10^{-4} °С, что затруднительно даже при помещении кюветы в металлический блок с большой теплоемкостью и использовании эффективных теплообменников. Последние, в свою очередь, увеличивают мертвый объем между колонкой и кюветой детектора, что приводит к дополнительному размыванию хроматографических зон и снижению эффективности разделения.

Рис. 8.12. Схема рефрактометра оптического отклонения:



1—лампа; 2—маска; 3—линза; 4—рабочая кювета; 5—сравнительная кювета; 6—зеркало; 7—фотоспротивление; 8—усилитель; 9— пластина установки оптического нуля; 10—самописец

Рефрактометры весьма чувствительны к пульсации потока, поэтому при работе с этими детекторами необходимо применять демпфирующие устройства.

Промышленность производит рефрактометрические детекторы трех типов, различающиеся принципами измерения.

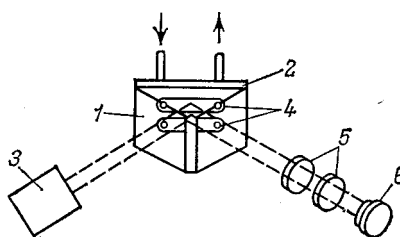
Рефрактометр оптического отклонения — наиболее распространенный тип данного прибора. Принцип действия детектора основан на том, что при прохождении луча света через кювету, заполненную двумя жидкостями с различными показателями преломления, луч отклоняется на угол, пропорциональный разности этих показателей преломления.

Принципиальная схема рефрактометра показана на рис. 8.12. Свет от лампы 1 проходит через маску 2, собирается в параллельный пучок линзой 3 и попадает в кювету. Кювета представляет собой две ячейки в виде призм с общей гранью; в измерительную ячейку 4 поступает элюент из колонки, а сравнительная ячейка 5 заполнена чистым растворителем. При изменении показателя преломления в измерительной ячейке луч

света отклоняется от первоначального направления, отражается зеркалом 6 обратно в кювету, снова отклоняется и через линзу 3 фокусируется на фотоспротивлении 7. Последнее вырабатывает электрический сигнал, пропорциональный положению луча света, который усиливается электронным усилителем 8. Специальная стеклянная пластина 9 служит для установления оптического нуля.

Рефрактометр оптического отклонения может работать с любыми растворителями и имеет широкий диапазон линейности. Вместимость кюветы обычно равна 10 мкл, а порог чувствительности составляет $5 \cdot 10^{-8}$ – $2 \cdot 10^{-7}$ ед. рефракции. К этому типу принадлежат широко известный рефрактометр R401 фирмы «Уотерс» и уникальный лазерный рефрактометр ЛР-1 [24] с вместимостью кюветы всего 0,1 мкл.

Рис. 8.13. Схема рефрактометра Френеля:



1 — призма; 2 — зеркальная стальная пластина; 3 — проектор;
4 — кюветы; 5 — фокусирующие линзы; 6 — двойное фотоспротивление

Рефрактометр Френеля. Действие данного детектора основано на законе Френеля, который гласит, что количество света, отраженного от поверхности раздела двух веществ (жидкости и стекла), пропорционально разности показателей преломления этих веществ и углу падения света на поверхность раздела. Для получения максимальной чувствительности угол отражения должен быть близок к критическому. Основой конструкции рефрактометра Френеля (рис. 8.13) является стеклянная призма 7 с углом при вершине 90° , основание которой является верхней стенкой кювет. Измерительная и сравнительная щелевидные кюветы образованы отверстиями специальной формы в тонкой прокладке из фторопласта, зажатой между основанием призмы 1 и зеркальной пластиной из нержавеющей стали 2 (нижняя стенка кювет), которая одновременно является теплообменником. Проектор 3 вырабатывает два параллельных пучка света, которые сфокусированы на поверхности раздела стекла и жидкости в рабочей и сравнительной кюветах 4. Световой поток в кюветах проходит через тонкий слой жидкости и отражается от пластины 2. Отраженный свет фокусируется линзами 5 на измерительное и сравнительное фотоспротивления 6. Разностный сигнал усиливается электронным усилителем.

Проектор 3 смонтирован на отдельной оптической скамье, которую можно поворачивать для изменения угла падения и поддержания угла отражения, близким к критическому.

Главным достоинством рефрактометра Френеля является малая вместимость кюветы — 3–5 мкл, что позволяет принять его в сочетании с современными высокоэффективными колонками.

Основные недостатки — необходимость использования двух призм (1,31–1,44 и 1,40–1,55) для перекрытия всего требуемого диапазона показателей преломления растворителей и очень высокие требования к чистоте кювет. Этот детектор наиболее чувствителен к пульсациям потока и имеет меньший диапазон линейности, чем рефрактометр оптического отклонения, а порог чувствительности — $\sim 10^{-7}$ ед. рефракции.

Основным производителем рефрактометров Френеля является фирма «LDC» (детекторы типа «Рефрактомонитор»).

Интерферометрический рефрактометр относительно недавно разработан фирмой «Оптилаб» (Швеция) и выпускается только разработчиком. Он представляет собой интерферометр с двумя Проточными кюветами, который измеряет разность показателей Преломления в единицах длины световой волны. По данным фирмы, у этого детектора очень высокая линейность сигнала, а чувствительность на порядок выше, чем у других дефрактометров. Однако небольшой опыт работы с этим детектором показывает, что для получения стабильной нулевой линии требуется очень тщательное термостатирование всей хроматографической системы, и полностью реализовать его высокую чувствительность практически не удается.

8.4.4. Флуориметрические детекторы

Детектирование по флуоресценции применяют в биологии, медицине, фармакологии, при анализе пищевых продуктов и контроле загрязнения окружающей среды. Флуоресцентными свойствами, т.е. способностью излучать свет (в видимой области спектра) под действием ультрафиолетового излучения, обладают многие биологически-активные вещества: лекарства, витамины, стероиды. Красители, соединения с сопряженными связями, в том числе полиядерные ароматические углеводороды, также можно определять с помощью флуориметрического детектора, при этом чувствительность определения велика.

Интенсивность флуоресцентного излучения зависит от интенсивности возбуждающего излучения и квантового выхода процесса возбуждения. Поэтому для повышения чувствительности метода следует использовать достаточно мощные источники света, например газоразрядные лампы или лазеры. Применение лазеров позволяет детектировать количество вещества на уровне 10^{-12} г. Метод двухфотонного лазерного возбуждения отдаёт возможность использовать лазер с более низкой энергией, например, аргоновый. Для внедрения в практику такого метода необходимо иметь достаточно широкий спектр лазеров, перестраиваемых по длинам волн. Чувствительность детекторов по флуоресценции для некоторых соединений оказывается на несколько порядков выше чувствительности детекторов по поглощению, поскольку отсчет удается вести фактически от интенсивности регистрируемого излучения, близкой к нулю, на которую не накладывается возбуждающее излучение.

Разработаны детекторы, которые могут одновременно работать и как спектрофотометры и как флуориметры. Детекторы с монохроматорами, позволяющими выбрать необходимые длины волн для возбуждающего и флуоресцентного излучения, обеспечивают высокую чувствительность и селективность, однако они оказываются значительно более дорогими, чем флуориметры с постоянной спектральной полосой. Одним из надежных флуориметров является детектор «Кратос».

В качестве причин уменьшения чувствительности детекторов следует указать на поглощение излучения при высокой концентрации вещества в ячейке, а также на потерю излучения за счет отражения от окошек ячейки. Поэтому при работе с флуориметром следует использовать достаточно разбавленные растворы, кроме того, возможно применение детекторов без окошек, например с He—Cd-лазером.

Некоторые нефлуоресцирующие соединения разделяют в виде производных с флуорогенными веществами. Производные получают до хроматографического разделения или после, вводя реагент в Т-образное устройство между колонкой и детектором. Амины и фенолы образуют диазильные производные при взаимодействии с 5-диметиламино-1-нафтилсульфохлоридом до разделения, а аминокислоты после разделения обрабатывают флуорескамином.

Флуориметр применяют при анализе микропримесей, когда мала концентрация растворенного вещества, подлежащего обнаружению. Хотя динамический диапазон флуориметра достаточно большой (10^4), его линейный динамический диапазон может быть ограничен для некоторых растворенных веществ относительно узким интервалом

концентраций (10-кратным). Для количественного анализа его следует проверять в интересующем интервале концентраций.

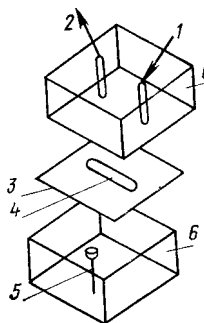
Перед количественным измерением необходимо убедиться в отсутствии фоновой флуоресценции, эффектов гашения и проверить отклик детектора на реальный образец.

Кислородосодержащие растворители гасят флуоресценцию, и их так же как и элюенты, поглощающие свет в области возбужденного излучения, нельзя применять. Галогенсодержащие растворители (хлороформ и метиленхлорид) должны быть использованы с осторожностью, так как имеют тенденцию ослаблять флуоресценцию. Если в растворителе нет флуоресцирующих веществ, флуориметр может работать в градиентном режиме. Флуориметр меньше, чем другие детекторы, зависит от изменений температуры или давления. Однако уменьшение температуры или увеличение вязкости некоторых растворителей затрудняет флуоресценцию.

8.4.5. Другие детекторы

Кроме детекторов, описанных выше, для ВЭЖХ используют и другие приборы: электрохимический, инфракрасный, детектор с диодной матрицей, масс-спектрометрический, транспортный с пламенно-ионизационным детектированием, радиоактивный, по диэлектрической проницаемости, электронозахватный, кулонометрический и др. Одни из них обладают высокой селективностью или чувствительностью, другие дают важную качественную информацию. Рассмотрим более подробно некоторые из них.

Рис. 8.14. Электродная ячейка электрохимического детектора:



1 — выход колонки; 2 — к электроду сравнения; 3 — фтороплатовая прокладка;
4 — рабочая камера кюветы; 5 — рабочий электрод; 6 — блок ячейки

Электрохимический детектор. Этот детектор можно применять для анализа всех веществ, обладающих электрохимической активностью, т. е. способ при определенном потенциале окисляться или восстанавливаться, соответственно отдавая или принимая электроны. В водных растворах эти потенциалы могут быть от +1,2 до -0,8 В (электрод сравнения — хлорсеребряный).

Вещества, содержащие фенольную, индольную или альдегидную группы, способны окисляться при низких потенциалах (0,4—0,7 В), а вещества с нитро- или кетогруппами — восстанавливаться. Так, важные в биологии классы веществ — катехоламины и 5-гидроксииндолы — в этих условиях способны окисляться, отдавая два электрона. При этом и возникает ток в кювете детектора, который затем усиливается амперометрическим детектором.

Электродная ячейка (кювета), схема которой представлена на рисунке 8.14, состоит из двух блоков, разделенных фтороплатовой прокладкой с вырезом, представляющим собой рабочую камеру. В центре камеры расположен тонкослойный электрод (анод) из стеклоуглерода. Электрод сравнения размещается на выходе из ячейки. Вместимость рабочей камеры 1 мкл, что позволяет работать с микроколонками.

Электрохимический детектор более селективен при низких потенциалах рабочих электродов. Для 5-гидроксииндолов нужен потенциал 0,5—0,55 В, для катехоламинов — 0,5—0,7В, для пептидов — 0,9—1,2В. Чувствительность и специфичность электрохимического детектора высокие. По чувствительности они не уступают кулонометрическим детекторам, хотя окисляющая способность тонкослойных электродов с рабочей поверхностью 2—4 мм² составляет лишь 1—10% от количества анализируемого вещества. Нижний предел детектирования катехоламинов и 5-гидроксииндолов составляет от 5 до 20 пг введенного в колонку вещества. На рис. 8.15 приведена хроматограмма 5-гидроксииндолов из солянокислого экстракта 0,5 мл плазмы крови.

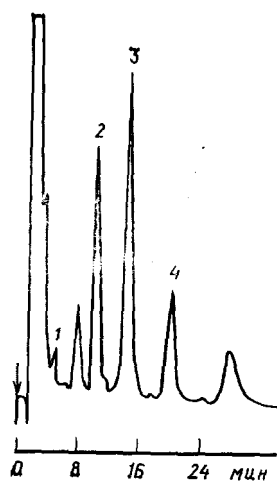
При работе с электрохимическим детектором необходимо учитывать следующее. Фоновые шумы тем ниже, чем чище используемые реактивы, поэтому фосфаты нужно очищать перекристаллизацией, использовать высокочистую воду и растворители марок «осч» или для ВЭЖХ. Шлифовать поверхности рабочего электрода следует по мере его загрязнения и увеличения шумов не чаще 1 раза в месяц с последующей промывкой его 50%-ным метанолом. Обязательным является хорошее дегазирование растворителей, желательно продувкой гелием.

Электрохимический детектор находит применение в анализе катехоламинов, серотонина, ацетилхолина и их метаболитов, нейропептидов, ряда ледарственных препаратов. Его можно использовать для анализа фенолов, ароматических аминов, тиоспиртов, аскорбиновой кислоты, мочевой кислоты и других веществ в режиме окисления. В режиме восстановления им можно детектировать хиноны, нитросоединения, металлоорганические и другие соединения.

Существуют другие типы ячеек, кроме вышеописанной, в том числе с капающим ртутным электродом, трубчатым электродом, многоэлектродные ячейки и др.

УФ-детектор с диодной матрицей. Как уже отмечалось выше, в УФ-детекторах широко распространенных типов используют прохождение через кюветы (как образца, так и сравнительной) монохроматического света. В УФ-детекторе с фильтрами такой свет из линейчатого спектра испускания ртутной лампы вырезается фильтром, а в спектрофотометре — вырезается из широкого спектра испускания дейтериевой лампы с использованием дифракционной решетки. Только в сканирующем спектрофотометре (например, с «прыгающим» зеркалом, используемым в «Милихроме») кювета освещается последовательно несколькими монохроматическими лучами света.

Рис. 8.15. Хроматограмма 5-гидроксииндолов из солянокислого экстракта 0,5 мл плазмы крови, полученная на колонке размером 200x3,2 мм с нуклеосилом С18 (5 мкм), подвижная фаза — 0,1 М нитратно-фосфатный буферный раствор с 12% метанола и 0,5 мМ октилсульфата, рН=4,6, расход 0,8 мл/мин, потенциал +0,5 В, проба 50 мкл:



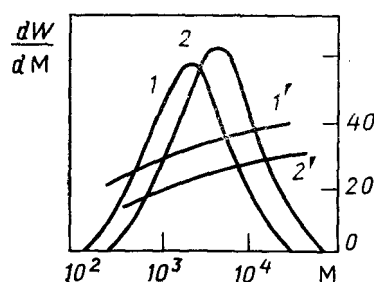
1 — 5-окситриптофан; 2 — 5-оксииндолил-3-уксусная кислота;
3 — N-метилдопамин (стандарт); 4 — серотонин

В последнее время появилось очень изящное решение, позволяющее получать непрерывно информацию о полном УФ-спектре веществ, проходящих через кювету. В этом случае через кювету проходит полихроматический свет, т.е. весь непрерывный спектр испускания дейтериевой лампы, который после кюветы попадает на дифракционную решетку, где делится на монохроматические пучки, каждый из которых попадает далее на свою фотоячейку (фотодиод), расположенные в ряд или линейку. Отсюда название — детектор с диодной матрицей или диодной линейкой. С каждой такой ячейки можно в любой момент получить информацию о том, как вещество, проходящее через кювету, поглощает свет при данной длине волны. Существуют диодные линейки с разным числом диодов: 8, 32, 64 и более. Если вывести информацию с каждого диода на самописец, то он запишет столько хроматограмм, сколько есть диодов, каждую при своей длине волны. Каждая такая хроматограмма может быть рассмотрена, рассчитана, исследована в совокупности с любой другой или другими с привлечением математических методов с целью нахождения примесей в пиках, примесей, которые не детектируются при использовании какой-то одной длины волны. Если такой детектор подключить к многоканальному компьютеру, он может вести обсчет хроматограмм, например, при 8 длинах волн. Если используют достаточное число диодов, может быть в любой момент записан полный УФ-спектр вещества в кювете.

Вообще можно считать, что детектор с диодной матрицей—это детектор, наиболее приближающийся к универсальному детектору для исследовательской работы. Он позволяет, сняв только одну хроматограмму, получить очень большой объем информации не только количественной, но и качественной. Такие детекторы выпускаются в настоящее время уже несколькими фирмами, и появляются работы по их использованию, особенно там, где объекты исследования достаточно сложны, а объемы проб очень ограничены. Хотя стоимость таких детекторов с полным набором требуемого обслуживающего оборудования (достаточно мощных компьютеров, многоканальных интеграторов, графопостроителей, дисководов с дисками и т.д.) достаточно высока, однако можно ожидать относительно быстрого снижения их цены в будущем и расширения применения в разных областях.

ИК-детекторы. Детекторы, основанные на поглощении в инфракрасной области спектра, в ВЭЖХ применяют сравнительно недавно и в достаточной степени ограничено. Главной причиной такого положения является несовместимость ИК-детектора с основными растворителями, применяемыми в адсорбционной и обращенно-фазной хроматографии, а также сравнительно невысокая чувствительность. Практически для детектирования можно использовать только некоторые полосы с наиболее высокими молярными коэффициентами поглощения, а в качестве подвижной фазы — главным образом хлорированные углеводороды. В частных случаях, например при детектировании по поглощению карбонильной группы или двойной связи, для работы пригодны очень многие растворители в широком диапазоне полярности — от гексана до ацетонитрила и метанола.

Рис. 8.16. ММР (1, 2) и распределение по составу (1', 2') сополимеров пиперилена с метилметакрилатом (ММА); продолжительность сополимеризации: 1 ч (1, 1'). 18 ч (2, 2')



Несмотря на эти недостатки этот детектор имеет несомненные достоинства. Во-первых, он является одновременно универсальным и селективным: при детектировании по поглощению С—Н-связи он обнаруживает практически любые органические вещества, а по поглощению функциональных групп (например, ОН, С=О, С=C и т.д.) — только соединения, содержащие такие группы. Во-вторых, сигнал детектора почти не зависит от молекулярной массы вещества, что существенно облегчает количественную интерпретацию результатов. В-третьих, он может работать при температурах до 150 °С. Все эти особенности обуславливают ценность ИК-детектора для эксклюзионной хроматографии синтетических полимеров.

При исследовании сополимеров ИК-детектор позволяет получить уникальную информацию о композиционной неоднородности, которую зачастую нельзя получить никакими другими методами.

На рис. 8.16 приведены результаты исследования двух образцов сополимеров пиперилена с метилметакрилатом. Композиционную неоднородность оценивали по соотношению соответствующих высот на двух хроматограммах, записанных ИК-детектором Миран-1А по поглощению групп С—Н ($\lambda=3,43$ мкм) и С=О ($\lambda=5,75$ мкм). Первая Хроматограмма отражала общее ММР сополимера, а вторая — распределение метилметакрилата в пределах этого ММР. Хроматограммы снимали на составной колонке размером 2(300X7,8 мм) с μ -сферогелем ($10^3\text{A}+10^5\text{A}$) при 40 °С и скорости потока тетрагидрофурана 1 мл/мин. Данные рис. 8.16 наглядно показывают изменение дифференциальных кривых ММР, состава и композиционной неоднородности на начальной и конечной стадиях реакции, которые обусловлены различной реакционной способностью сомономеров.

Чувствительность ИК-детектора в оптимальных условиях достигает 10^{-6} — $5 \cdot 10^{-7}$ г/мл, т. е. сопоставима с чувствительностью рефрактометра.

В последние годы ведутся интенсивные исследования по использованию в качестве детекторов ИК-спектрофотометров с преобразованием Фурье, что позволит повысить их чувствительность примерно на порядок.

8.5. СИСТЕМЫ РЕГИСТРАЦИИ И ОБРАБОТКИ ДАННЫХ

8.5.1. Самописцы

Для записи сигнала детектора в ВЭЖХ нужно использовать высококачественные самописцы, способные без искажений регистрировать узкие пики. Наилучшие результаты получают на приборах с высоким входным сопротивлением (≥ 1 МОм) и скоростью движения пера 0,5—1 с на всю ширину шкалы. Самописец должен иметь не менее 5 скоростей протяжки бумаги в диапазоне 0,2—5 см/мин, ширину ленты не менее 200 мм и эффективное подавление шумов электросети. В связи с тем, что детекторы разных типов, как правило, имеют различное напряжение выходного сигнала, очень желательно наличие переключения входа самописца на 1, 10 и 100 мВ, а также регулирование нуля в пределах всей шкалы. Для одновременной работы на двух детекторах целесообразно использовать двухперьевой самописец. Кроме того, многие наиболее современные самописцы оснащаются дополнительными устройствами, в частности обратной перемоткой ленты, что очень удобно для сравнительной записи хроматограмм, отметчиками начала регистрации, устройствами для автоматического подъема пера при выходе за пределы ленты и «ДИСК»-интеграторами.

8.5.2. Интеграторы

Механические интеграторы типа «ДИСК», описанные во многих руководствах по газовой хроматографии, до сих пор используют достаточно широко. Они дают хорошие

результаты при измерении пиков неправильной формы, но ошибка заметно увеличивается при дрейфе базовой линии и неполном разделении пиков. Кроме того, их точность зависит от характеристик самописца и существенно снижается, если пик выходит за пределы шкалы.

Электронные цифровые интеграторы представляют собой высокоточные приборы, автоматически измеряющие время удерживания и площадь пиков, которые фиксируются печатающим устройством. Более сложные модели интеграторов учитывают дрейф базовой линии, рассчитывают плохо разделенные пики методом перпендикуляра, а пики малой площади, выходящие на «хвосте» другого пика,—по наклонной нулевой линии, тангенс угла наклона которой определяется автоматически.

Значительно большими возможностями обладают современные интеграторы с элементами вычислительной техники. Они имеют память и набор различных программ для обработки данных. Тип обработки выбирает оператор. Эти устройства регистрируют хроматограмму и по окончании разделения немедленно печатают результаты расчета состава смеси, что особенно важно для серийного количественного анализа. Точностные характеристики данных систем, как правило, выше, чем у хроматографов, поэтому ошибки определения минимальны.

Компьютерные системы обработки данных являются наиболее сложными и дорогими. Они делятся на две группы. Устройства первой группы предназначены только для обработки данных и представляют собой малогабаритные вычислительные машины с большим объемом памяти, которые выполняют разнообразные сложные расчеты (например, в эксклюзионной хроматографии) и представляют результаты в цифровой и графической форме. Устройства, относящиеся ко второй группе, кроме обработки данных, осуществляют управление различными элементами хроматографической системы. К таким элементам относят, в частности, установку параметров процесса (температура, скорость потока, условия детектирования и др.) и состав подвижной фазы в изократическом и градиентном элюировании, режим работы автоматического дозатора и т.п. Все необходимые параметры постоянно контролируются, что гарантирует их стабильность в процессе разделения.

Применение компьютерных систем позволяет исследователю осуществить практически любые аналитические комбинации по составленной им программе. Даже столь краткая информация дает представление о поистине безграничных возможностях применения компьютерной техники в хроматографии. Более детальное обсуждение этого вопроса выходит за рамки данной книги.

8.6. ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ УСТРОЙСТВА ДЛЯ ВЭЖХ

Наряду с основными узлами, описанными выше, в хроматографическую систему входит ряд вспомогательных элементов и принадлежностей, описание которых приведено ниже.

8.6.1 Сосуды для подвижной фазы

Вместимость сосуда должна обеспечить дневную потребность растворителя без его замены. При односменной аналитической работе удобны стеклянные бутылки вместимостью 0,7— 1 л. Для повышения безопасности при круглосуточной или препаративной работе лучше использовать резервуары из нержавеющей стали вместимостью 5—20 л. В отдельных случаях (применение легко окисляющихся или особо взрывоопасных растворителей) пространство над жидкостью продувают с небольшой скоростью инертным газом.

Большое значение имеет тщательная дегазация подвижной фазы. Предпочтительнее выполнять эту операцию непосредственно в рассматриваемом сосуде, чтобы исключить переливание растворителя. При использовании смешанных подвижных фаз, особенно, если их компоненты заметно различаются по температуре

кипения, весьма желательно непрерывно перемешивать содержимое сосуда магнитной мешалкой для поддержания однородности системы.

Некоторые приборы комплектуются специальными сосудами для подвижной фазы, которые в наибольшей степени удовлетворяют перечисленным требованиям, однако хорошие результаты можно получить и на значительно более простых системах. Так, при осуществлении дегезации продувкой гелием в качестве сосуда используют стандартную стеклянную бутылку с завинчивающейся полиэтиленовой крышкой, в которую помещают элемент магнитной мешалки. В крышке проделывают два отверстия, через которые вводят трубки подачи гелия и отбора растворителя. Трубки не должны доходить до дна бутылки на такое расстояние, чтобы за них не задевал магнитный элемент. Избыток газа выходит в атмосферу через зазоры между трубками и крышкой.

8.6.2. Проточные фильтры

Основная часть механических загрязнений попадает в подвижную фазу с атмосферной пылью. Присутствие механических примесей в растворителе недопустимо, так как они нарушают нормальную работу насосов, дозаторов и колонок. Мягкие волокнистые частицы наиболее интенсивно засоряют клапаны насоса, а твердые абразивные частицы, кроме того, могут поцарапать поршень и повредить его уплотнение.

В хроматографической системе может быть установлено от одного до трех фильтров, различающихся по назначению и техническим характеристикам.

Для удаления механических примесей из растворителя применяют фильтр низкого давления с большой поверхностью, расположенный до входа в насос. Наиболее распространенный фильтр этого типа представляет собой полый цилиндр из металлокерамики или пористой нержавеющей стали со штуцером для отвода очищенного растворителя из внутреннего пространства цилиндра. При помощи штуцера фильтр укрепляют на конце фторопластовой трубки и опускают в сосуд с подвижной фазой. Другой конец трубки соединяют с входом насоса. Обычно используют фильтры с размером пор 2—5 мкм. Растворитель протекает через фильтр за счет вакуума, создаваемого насосом в такте всасывания. Чтобы обеспечить нормальное перезаполнение насоса, сопротивление фильтра должно быть минимальным. Поэтому при высоких скоростях потока, в частности в препаративной хроматографии, используют фильтры большого размера. Установка фильтра низкого давления является обязательной!

В процессе работы насоса постепенно изнашиваются уплотнения поршней. Продукты эрозии уплотнений медленно, но верно забивают каналы инжектора и входной фильтр колонки. Для удаления этих частиц рекомендуется устанавливать между насосом и инжектором второй фильтр, рассчитанный на высокое давление. Размер его пор не должен быть больше, чем у входного фильтра колонки. Этот фильтр при достаточном размере поверхности должен иметь возможно меньший объем, что является существенным для работы в режиме градиентного элюирования, если градиент формируется в зоне низкого давления. Третий фильтр с размером пор 0,5—2 мкм иногда устанавливают непосредственно перед колонкой. Предколоночный фильтр защищает колонку от продуктов эрозии уплотнения инжектора и от примесей, содержащихся в пробе. Этот фильтр должен иметь очень маленький мертвый объем, так как он расположен в критической зоне, где любое увеличение объема приводит к размыванию полосы, т. е. снижает эффективность разделения. Лучшие конструкции данного фильтра имеют мертвый объем 4—7 мкл.

Наиболее целесообразно использовать предколоночный фильтр в эксклюзионной хроматографии полимеров, так как в этом случае вероятность присутствия нерастворимых частиц в анализируемых образцах гораздо выше, чем при анализе смесей индивидуальных соединений. При установке такого фильтра в систему с общей эффективностью 20000 т.т., включающую две эксклюзионные колонки длиной по 30 см, потеря эффективности составляет 1000—1500 т.т.

В других вариантах жидкостной хроматографии широко применяют предколонки. Они защищают основную колонку как от химических, так и от механических загрязнений, т. е. являются высокоэффективными фильтрующими элементами.

8.6.3. Устройства для измерения давления

Рабочее давление в жидкостной хроматографии является очень важным параметром, который обязательно должен контролироваться. Измерители давления устанавливают на выходе насоса. В комплектных приборах и многих насосных системах в качестве измерителей давления используют тензодатчики с цифровой индикацией показаний. Они имеют высокую точность и малый внутренний объем, что позволяет быстро заменять растворитель в системе. Кроме того, информация о давлении, передаваемая в виде электрического сигнала, дает возможность реализовать простую схему установки предельно допустимого диапазона давлений, при отклонении от которого насос автоматически отключается.

К недостаткам этих устройств можно отнести усложнение аппаратуры и высокую цену.

Если насосная система не снабжена тензодатчиком, обычно применяют манометры с трубкой Бурдона. Они достаточно надежны, просты, дешевы и обладают демпфирующими свойствами. Главными недостатками манометров в условиях ВЭЖХ являются большой непромываемый объем, ограниченная коррозионная стойкость и меньшая, чем у тензодатчиков, точность измерения. Проявление указанных недостатков можно существенно уменьшить путем выбора манометра с оптимальным диапазоном измерения и его присоединения к системе через длинный капилляр с внутренним диаметром $\leq 0,5$ мм. Некоторыми фирмами выпускаются также проточные манометры, не имеющие непромываемого объема.

8.6.4. Демпферы

Поршневые и диафрагменные насосы, наиболее широко используемые в современной ВЭЖХ, создают пульсирующие потоки, что затрудняет детектирование и приводит к ухудшению характеристик колонок. Для сглаживания пульсации используют различные демпфирующие устройства, вместимость которых изменяется с изменением давления. Так, в трубках Бурдона изменение объема происходит за счет сжатия и расширения находящегося в них газа. Простейший демпфер состоит из манометра Бурдона и гидравлического сопротивления, в качестве которого обычно используют длинный отрезок стального капилляра с внутренним диаметром $\leq 0,5$ мм.

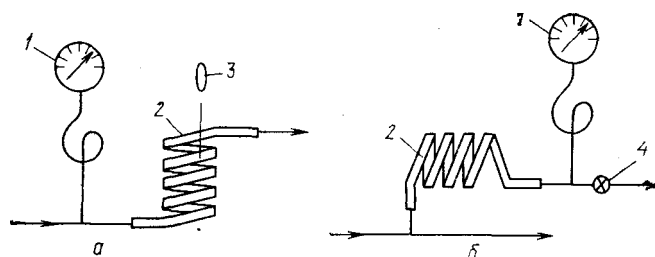
Если трубка манометра заполнена жидкостью, происходит только сглаживание пульсации за счет рассеивания части энергии сжатой жидкости при разгибании трубки, и эффективность демпфирования снижается. Падение давления в таком демпфере зависит от сопротивления капилляра и может достигать 3—4 МПа.

Хорошими демпфирующими свойствами обладают прокатанные (сплюснутые) тонкостенные трубки из нержавеющей стали, свернутые в плотную спираль в виде пружины. Устройство, изготовленное из трубки длиной 1,8 м с наружным диаметром около 6 мм и толщиной стенки 0,5 мм, снижает уровень пульсации на 95% при рабочем давлении до 20 МПа. Демпферы этого типа нетрудно изготовить самостоятельно, прокатав трубку на вальцах. Варьируя диаметр, толщины и длину трубки, получают демпферы с наибольшей эффективностью в определенном диапазоне рабочего давления.

Эффективность демпфера пропорциональна длине трубки, а «жесткость» возрастает с уменьшением ее диаметра. Эти устройства выгодно отличаются от трубок Бурдона отсутствием непромываемого объема, но последний часто слишком велик, что ограничивает их использование при градиентном элюировании. Эти демпферы обычно включают по проточной схеме (рис. 8.17, а). По некоторым данным, включение по схеме 8.17, б повышает эффективность демпфирования. Для промывки устройства при смене растворителя предусмотрен кран 4. Последняя схема имеет еще одно

преимущество: растворитель, находящийся в манометре, практически не может попасть в поток подвижной фазы.

Рис. 8.17. Варианты включения демпфера в хроматографическую систему:



1 — манометр; 2 — демпфер; 3 — поперечное сечение демпфера; 4 — запорный кран

В мембранных демпферах колебания потока сглаживаются [за счет перемещения упругой металлической диафрагмы (мембраны); с другой стороны к мембране приложено постоянное давление, создаваемое газом, пружиной или жидкостью с высоким коэффициентом сжимаемости. Лучшие конструкции мембранных демпферов имеют очень маленький внутренний объем и являются наиболее пригодными для работы с градиентным элюированием.

8.6.5. Шприцы для ввода проб

В ВЭЖХ пробу вводят в дозатор при помощи микрошприцов. Шприцы, применяемые для ввода в петлевые краны-дозаторы, в принципе аналогичны используемым в газовой хроматографии, но снабжены иглой, кончик которой обрезан перпендикулярно оси. Шприцы различаются по способу крепления иглы (склеенная или сменная) и по уплотнению рабочей пары (притертый металлический плунжер или шток с фторопластовым уплотнением). Самые простые и дешевые шприцы имеют склеенную иглу и металлический плунжер. Шприцы с фторопластовым уплотнением (Gas Tight) характеризуются повышенной коррозионной стойкостью и герметичностью: через уплотнение не происходит утечки газа при его давлении до 0,8—1,5 МПа. Кроме того, они гораздо легче отмываются, а изношенный уплотняющий элемент достаточно просто заменить. Эти шприцы особенно рекомендуются для работы с высокополярными и коррозионно-активными веществами и с подвижной фазой, представляющими собой солевые и буферные растворы. Практически все шприцы со сменной иглой можно применять как в газовой, так и в жидкостной хроматографии: нужно только установить в них соответствующую иглу.

При работе с кранами-дозаторами, рассчитанными на частичное заполнение дозы, с целью повышения точности вводимого объема пробы следует использовать шприцы минимально возможного объема (обычно от 10 до 50 мкл). При полном заполнении петли вместимость шприца должна быть как минимум вдвое больше объема дозы. В эксклюзионной хроматографии, как правило, вводят полную дозу, объем которой значительно больше, чем в других видах ВЭЖХ, и составляет 50—300 мкл. В соответствующих кранах-дозаторах канал ввода пробы обычно оснащен герметично закрепленной иглой, в которую вставляют шприц, предназначенный для работы с обычными съемными (не путать со сменными) иглами. Для таких дозаторов лучше всего использовать шприцы вместимостью 100—1000 мкл с фторопластовым уплотнением и посадочным конусом (например, шприцы Гамильтон, типа TLL), так как в случае стеклянного или металлического посадочного конуса герметичность этого соединения нарушается значительно быстрее. Такие же шприцы применяют и в препаративной ВЭЖХ.

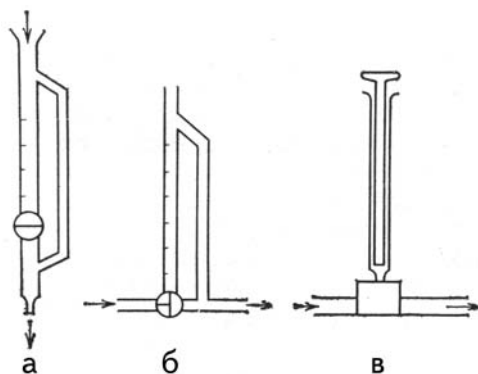
Для введения пробы непосредственно в поток элюента через прокалываемую мембрану (шприцевые дозаторы) используют специальные шприцы с углом заточки иглы 22° . Эти шприцы имеют особые уплотнения, рассчитанные на давления до 35 МПа, и оснащены защитными приспособлениями, предотвращающими выбрасывание поршня в момент прокола мембраны.

Если давление в колонке не превышает 7—10 МПа, можно применять шприцы вместимостью до 50 мкл с фторопластовым уплотнением поршня.

8.6.6. Измерители скорости потока

Скорость потока и ее стабильность во времени существенно влияют на правильность и воспроизводимость характеристик удержания в ВЭЖХ. Эти параметры особенно важны в эксклюзионной хроматографии, где даже незначительное изменение скорости потока приводит к большим ошибкам определения молекулярных масс полимеров. Кроме того, изменение скорости потока указывает на неполадки в аппаратуре (например, негерметичность жидкостного тракта или засорение клапанов насоса), поэтому желательно измерять ее не менее двух-трех раз в день.

Рис. 8.18. Расходомеры:



а—типа бюретки; б—с подачей растворителя снизу; в — пузырьковый

Скорость потока можно определять, взвешивая растворитель, вытекающий из колонки за определенный промежуток времени; метод достаточно точен (ошибка менее 0,5%), но неудобен и длителен. Скорость потока часто находят по времени заполнения определенного объема бюретки или стеклянной трубки, ограниченного двумя рисками. В варианте, показанном на рис. 8.18, а, растворитель поступает в расходомер сверху, а в варианте 8.18,б—снизу. На рис. 8.18,б показан пузырьковый расходомер, в котором вводят шприцом в элюат пузырек воздуха и измеряют время прохождения пузырька между рисками. Эти расходомеры удобны в работе и дают погрешность около 1%, измерение занимает не более 2—3 мин. С нашей точки зрения, несколько более точной и удобной является конструкция, показанная на рис. 8,18,6. Имеются также значительно более сложные системы измерения скорости потока, которыми оснащены хроматографы высокого класса.

8.6.7. Термостаты колонок

Повышение температуры разделения улучшает эффективность колонок в обращенно-фазной, ионообменной и эксклюзионной хроматографии. Стабилизация температуры также повышает точность количественных определений, поэтому использование термостатов—весьма желательно, а иногда обязательно.

В ВЭЖХ чаще всего применяют воздушные термостаты с интенсивным перемешиванием воздуха, в которых расположены теплообменник для подогрева растворителя,

дозатор и колонки. Для обеспечения безопасности работы термостат продувают азотом и часто устанавливают в нем датчики, реагирующие на появление паров органических растворителей и включающие световую или звуковую сигнализацию.

Защиту от перегрева, который может произойти при неисправности электронной схемы, осуществляют включением в электрическую цепь специальных вставок, изготовленных из сплавов с температурой плавления 100—150°C. Иногда для термостатирования используют нагреваемые металлические блоки с профрезерованными пазами, в которые вставляются колонки, а также водяные рубашки, соединенные с жидкостными термостатами.

Главная трудность использования этих конструкций заключается в том, что размер пазов и рубашек должен строго соответствовать размеру и числу колонок и предколонок. В то же время в практике часто приходится собирать разделительные системы из колонок различных размеров. Это обстоятельство затрудняет использование указанных термостатирующих устройств, несмотря на их простоту. Кроме того, эти устройства обычно не предусматривают термостатирования инжектора и предварительного подогрева растворителя.

Для проведения большинства работ в ВЭЖХ вполне достаточным является диапазон термостатирования до 100°C с точностью поддержания температуры $\pm 0,5$ —1°C. В отдельных случаях, в частности в эксклюзионной хроматографии некоторых синтетических полимеров, необходимо термостатирование 1 до 150 °C.

8.7. КОНСТРУКЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ВЭЖХ, ТРЕБОВАНИЯ К ИХ ХИМИЧЕСКОЙ СТОЙКОСТИ И ПРОЧНОСТИ

Современный хроматограф для ВЭЖХ является прибором, материалы которого в процессе работы подвергаются сильным химическим и механическим воздействиям. Жидкостный тракт хроматографа подвергается воздействию воды, водных растворов кислот, щелочей и солей, при этом нередко при повышенной температуре, а также воздействию разнообразных органических растворителей, окислителей и восстановителей, при этом такое воздействие проводится при самых неблагоприятных условиях—при высоком давлении и на детали, подвергающиеся сильным механическим нагрузкам. Это предъявляет к конструкционным материалам приборов и оборудования чрезвычайно высокие требования, которым не все приборы отвечают, особенно для наиболее сложных условий работы.

Часто, сталкиваясь с необходимостью вводить в конструкцию хроматографа новые узлы и детали, нередко изготавливаемые самим исследователем или не предназначенные для ВЭЖХ, допускаются грубые ошибки в выборе конструкционных материалов, приводящие к катастрофическим последствиям (коррозионное или механическое разрушение узлов хроматографа, забивка каналов капилляров и фильтров, порча колонок и сорбентов и т.п.).

Основными конструкционными материалами для ВЭЖХ являются коррозионноустойчивая нержавеющая сталь, спецсплавы (значительно реже), стекло, керамические материалы (рубин, сапфир), полимерные материалы (в основном с наполнителями).

Отечественные приборы, как правило, изготавливают из нержавеющей стали Х18Н9Т. Основным конструкционным материалом для импортного оборудования является нержавеющая сталь марки 316, отличающаяся высокой коррозионной стойкостью и механической прочностью. Как правило, нержавеющие стали достаточно коррозионноустойчивы к обычно используемым в ВЭЖХ растворителям [126]. Исключение составляют некоторые сильные органические кислоты (муравьиная, щавелевая, трихлоруксусная, трифторуксусная и др.) в определенном диапазоне концентраций, хлорсодержащие растворители (метиленхлорид, хлороформ, тетрахлорид углерода и др.), особенно в сочетании с полярными модификаторами типа спиртов. Когда возникает необходимость в использовании таких растворителей или модификаторов,

всегда следует проверить коррозионную устойчивость нержавеющей стали, использованной в данном приборе, к этим средам. Сильную коррозию могут вызвать некоторые сильные и разбавленные неорганические кислоты, а также некоторые соли. Особенно опасным является действие хлороводородной кислоты и ее солей в кислых средах при $\text{pH} < 7$. В этом случае возможной является так называемая точечная коррозия, которая развивается на границах кристаллов металла и способна образовать тонкие, но чрезвычайно глубокие отверстия даже в толстостенных деталях из нержавеющей стали. Поэтому следует очень осторожно подходить к системам растворителей, разработанным для классической колоночной ЖХ и ТСХ и использующим HCl , NaCl и подобные компоненты, не действующие на классические колонки из стекла, на полимерные трубки и вполне пригодные для однократного разделения на сорбенте, но корродирующие приборы для ВЭЖХ и сорбенты в колонках, используемые многократно.

Особенно внимательно следует подходить к введению в конструкцию хроматографа деталей, изготовленных из другого металла, будь это сварка, припайка, конус или фильтр из титана, никеля, серебра или сплава. В случае электропроводящего растворителя при этом всегда возникает электрическая пара (гальванический элемент) и начинается уже не просто химическое, а электрохимическое разрушение одного из металлов с образованием продуктов коррозии, уменьшением прочности соединения и т.д. В этом случае прибор, долго и устойчиво работавший в неэлектропроводящих растворителях, может выйти из строя при смене растворителя на электропроводящий за несколько дней или даже часов. Такими узлами, где наиболее вероятно использование других металлов, обычно являются манометры (заварка конца трубки Бурдона, ее приварка к телу манометра), демпферы некоторых типов (приварка капилляров к сплюснутым трубкам демпфера), некоторые инжекторы, колонки и т.д. В рационально разработанной и выполненной конструкции все соединения должны выполняться с использованием конусов из того же металла или уплотнений с использованием высокоинертных полимеров.

Стекло используют в конструкциях современных хроматографов довольно редко, главным образом из-за его хрупкости и плохой работы на разрыв, хотя его химическая инертность известна. Методы упрочнения стекла путем закалки, нанесений упрочняющих пленок и другие приемы позволяют до известной степени преодолеть традиционную хрупкость стекла. В таком виде его используют для создания малых шприцевых насосов (например, в отечественном микроколоночном приборе «Милихром») на 5—6 МПа, колонок на 3—8 МПа, микрошприцев высокого давления. Тем не менее следует иметь в виду, что хотя современные методы позволяют очень сильно упрочнить стекло некоторых марок (например, колонки для ВЭЖХ из стекла производства ЧССР выдерживают при набивке давление 60 МПа и больше), тем не менее любой возникающий при работе на поверхности такого изделия дефект (царапина, трещина, растворение покрытия) могут привести к мгновенному разрушению изделия и выходу хроматографа из строя. Необходимы чехлы, защищающие от поражения осколками.

Рубин и сапфир ввиду их высокой твердости и возможности их обработки до очень высокого класса чистоты используют для изготовления поршней и шариковых клапанов с их седлами. Они работают надежно и обладают высокой химической устойчивостью к растворителям, солям, кислотам и щелочам.

Полимерные материалы, используемые в ВЭЖХ, можно разделить на группы, различающиеся по прочности, химической стойкости и другим характеристикам.

Резины разных типов находят применение, особенно в старых приборах или предназначенных для учебных целей, в качестве мембран для ввода пробы в инжекторы с использованием микрошприцев высокого давления. Для систем обращенно-фазных рекомендуется использовать мягкую силиконовую резину, нормально-фазных— материалы на основе фторкаучука или нитрильных каучуков. Тем не менее все резины в большей или меньшей степени набухают в растворителях, выдерживают 20—40 вводов пробы до потери герметичности, загрязняют колонку продуктами разрушения мембраны, выделяют в растворитель стабилизаторы, пластификаторы, вулканизирующие и другие

добавки. Чем выше давление, тем труднее работать с такими мембранами. Попытки улучшить свойства таких мембран путем нанесения фторопластового покрытия со стороны растворителя дают только кратковременный эффект: после прокола защитные свойства покрытия практически не играют роли. Иногда резины применяют в качестве материала поршней или уплотнений поршней (колец) шприцев, однако их применение для ВЭЖХ также ограничено из-за набухания во многих растворителях.

В ВЭЖХ находят применение капиллярные трубки для соединений, шприцы, корпуса разовых микрофильтров, концентраторы проб, уплотнения поршней, колпачки для закрывания колонок из полиэтилена, полипропилена и их сополимеров, а также из других полиолефинов. Однако механическая прочность таких капилляров невысока, они набухают и растворяются в ряде растворителей. Те же недостатки и у шприцев — их в основном используют для работы с водой, метанолом, ацетонитрилом.

Некоторые фирмы используют наполненный полиэтилен для изготовления уплотнений поршней некоторых насосов, что является особенно нежелательным и опасным, так как ряд растворителей (таких как тетрагидрофуран, хлороформ, толуол) быстро разрушает такие уплотнения, при этом наполнитель попадает в поток растворителя и забивает капилляры, фильтры и другие узлы. На это следует обращать особое внимание при выборе насоса для ГПХ, в который часто применяют такие растворители.

Полиэферы, такие как нейлон-66, находят применение в ВЭЖХ в качестве материала для фильтров с малыми порами (0,2—1,0 мкм), устойчивых к действию практически всех основных растворителей для ВЭЖХ и используемых для очистки от взвешенных микрочастиц растворителей и образцов. Для этих целей применяют некоторые полиамиды. Эти материалы используют также для изготовления других вспомогательных изделий.

Широкое применение находят фторопласты разных типов как в ненаполненном, так и в наполненном виде. Из них изготавливают капилляры и трубки, уплотнения разного типа. Их химическая инертность совершенно уникальна, механическая прочность высокая, некоторые виды обладают достаточной прозрачностью, термостойкость фторопластов высокая (они не разлагаются в заметной степени до температур около 250—300 °С). Капилляры из толстостенного тефлона выдерживают давления до 10—15 МПа и более. Для соединения таких капилляров друг с другом на их концах обычно с помощью специального приспособления термомеханически или механически формируют фланцы, сдавливанием которых вместе специальными фитингами получают герметичное и полностью инертное соединение. Как конструкционный материал фторопласт имеет один серьезный недостаток: он обладает в ненаполненном виде хладотекучестью, что приводит к необходимости либо вводить препятствующие этому наполнители (например, графитовые волокна), либо заключать фторопластовые уплотнения в камеры, исключая свободные объемы и предотвращающие его вытекание в нагруженном состоянии. В наполненном виде фторопласт является наилучшим материалом для уплотнений поршней (обычно наполнитель также высокоинертный химически, например графитовые волокна), хорошо он работает и в уплотнениях инжекторов, если температура их работы невысока.

В последнее время широкое применение находят новые высокотермостойкие и устойчивые к действию растворителей, обладающие хорошими механическими свойствами полимеры, такие как полиимиды (например, материал «Веспел» фирмы Дюпон). Они, в отличие от фторопластов, не обладают текучестью и при повышенных температурах, что позволяет использовать их для уплотнений инжекторов, работающих при повышенных температурах (особенно это важно в ГПХ). Высокие конструкционные свойства таких материалов позволили создать конусные уплотнения для капилляров, которые легкогерметизируются и позволяют работать при давлениях, превышающих 35 МПа с фитингами разных видов и типов, легко присоединять колонки с фитингами разной формы. Недостатком этих материалов является несколько более низкая, чем у фторопласта, химическая инертность: они набухают и утрачивают свои свойства в некоторых растворителях при повышенных температурах.

ГЛАВА 9

КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Хроматографист, начинающий работать в области высокоэффективной жидкостной хроматографии, должен ознакомиться с основами качественного анализа. Качественный анализ применяют для идентификации известного продукта, полученного новым путем или находящегося в смеси с другими продуктами. Он необходим при выделении из сложных биологических, химических смесей различных компонентов, что особенно важно в медицине, криминалистике, экологии, для контроля за наличием некоторых лекарств и химических продуктов и их метаболитов в биоматериалах. Знакомство с основами качественного анализа поможет избежать типичных ошибок, например, отличить примеси в образце от примесей в растворителе или проверять чистоту вещества не на одной длине волны спектрофотометра, а на разных и т.д.

Прежде чем приступить к анализу, необходимо установить, весь ли образец элюируется из колонки данной системой растворителей или нет. Чтобы быть уверенным в полном элюировании, необходимо собрать всю вытекающую из колонки жидкость, упарить растворитель, взвесить остаток и найти степень извлечения образца.

Идентификацию компонентов в ВЭЖХ можно проводить тремя способами: 1) использовать информацию об удерживании; 2) исследовать зоны, полученные при разделении в колонке жидкостного хроматографа, методами спектрального или химического анализа; 3) непосредственно подключить спектральный анализатор к колонке.

Для регистрации пиков в хроматографии используют удерживаемый объем V_R или время удерживания t_R . Обе величины являются характеристикой вещества в данной хроматографической системе. Так как время удерживания разделяемого вещества состоит из времени взаимодействия в колонке и времени прохождения пустых участков трубки, оно меняется от прибора к прибору. Удобно иметь вещество, не удерживаемое данной колонкой, приняв его за стандарт, время и объем удерживания которого t_0 , V_0 . Хроматографирование вещества и стандарта необходимо проводить при одних и тех же условиях (давлении и скорости потока). Поправку на мертвый объем можно учесть, используя исправленное время удерживания t_R' или исправленный объем удерживания V_R , по формуле

$$t_R' = t_R - t_0$$

При идентификации по данным об удерживании, известные индивидуальные вещества, которые могут присутствовать в образцах, разделяют в той же самой хроматографической системе, и для них получают значения t_R . Сравнивая эти значения t_R с временем удерживания неизвестного пика, можно обнаружить, что они либо совпадают, и тогда вероятно, что пики соответствуют одному и тому же веществу, либо t_R известного вещества не соответствует t_R неизвестной зоны. Тогда все же возможна ориентировочная оценка значений t_R веществ, не доступных для непосредственного измерения степени их удерживания. Рассмотрим оба варианта.

В первом случае, очевидно, необходимо предварительное изучение образца для постулирования присутствия в нем конкретных веществ. При работе с простыми смесями нетрудно определить, совпадает ли степень удерживания зон образца и известных веществ, или нет, т. е. значения t_R одинаковы или различаются. В случае сложных смесей сразу несколько веществ могут элюироваться со схожими значениями t_R , и реально получаемые при хроматографическом разделении зоны перекрываются. В результате получение точных значений t_R для различных зон становится невозможным. Надежность идентификации возрастает при повышении разрешающей способности, более тщательном контроле условий разделения, многократном измерении значений t_R и усреднении найденных величин. При этом хроматографическое разделение известного и неизвестного веществ должно чередоваться. При разделении сложных смесей значение

t_R вещества может изменяться под влиянием матрицы самого образца. Такое воздействие возможно в начале хроматограммы и при перекрывании пиков; возможно также затягивание зон, о чем уже упоминалось.

В подобных случаях следует добавить стандарт к образцу в соотношении 1:1. Если вещества идентичны, значение t_R исходного вещества не изменится, и на хроматограмме получают только один пик. Если имеется прибор с циклической системой хроматографирования, то для надежности идентификации желательно смесь пропускать через колонку несколько раз.

Сведения о степени удерживания можно найти и в литературе, однако ценность этой информации ограничена. Так как колонки даже одной партии дают плохую воспроизводимость, литературные значения не всегда соответствуют истинному значению t_R на данной колонке. Для адсорбционной хроматографии возможно, однако, предсказание t_R на основании литературных данных. Другая трудность, связанная с использованием литературных значений t_R , — сложность их поиска в специальной литературе, хотя библиографические обзоры, публикуемые в *Journal of chromatography*, имеют обновляемый указатель по типам веществ.

Во втором случае, когда времена удерживания известных соединений и зон образца не совпадают, имеется возможность предсказать время удерживания неизвестного компонента. Вполне надежны предсказания относительного удерживания на основании данных о структуре в пространственно-эксклюзионной хроматографии. Менее точны они в адсорбционной, распределительной хроматографии и особенно при работе на химически привязанной фазе. Для ионной и ион-парной хроматографии веществ с известной pK_a возможны лишь приблизительные определения значений t_R . Всегда легче предсказать относительное удерживание или значение α , чем абсолютные значения k' . Относительные значения t_R легче оценить для родственных соединений или производных, например замещенных алкилкарбоновых кислот или производных бензола.

При изократическом разделении гомологов или олигомеров иногда наблюдается следующая закономерность:

$$\lg k' = A + Bn,$$

где A и B — константы для ряда выбранных образцов и для данной хроматографической системы (на одной и той же колонке, с такой же подвижной и неподвижной фазами); n — число одинаковых структурных единиц в молекуле образца.

В градиентном режиме при линейном изменении силы подвижной фазы уравнение приводится к виду

$$t_R = A' + B'n,$$

т. е. значения t_R линейно изменяются с изменением n .

Введение в молекулу образца функциональной группы j будет приводить к изменению k' в первом уравнении на некоторый постоянный коэффициент α_j в данной хроматографической системе. Можно получить групповые константы α_j для различных замещающих групп j , значения которых будут возрастать при увеличении полярности функциональных групп, во всех видах хроматографии, кроме обращенно-фазной, где значения констант будут уменьшаться с увеличением полярности.

Некоторые групповые константы α_j для различных замещающих групп j приведены в табл. 9.1.

В адсорбционной хроматографии первое уравнение не всегда применимо, так как оно справедливо при условии, что все изомеры имеют одно и то же значение k' , что не всегда соблюдается. Можно, однако, построить график зависимости $\lg k'$ одних и тех же соединений на одной колонке относительно $\lg k'$ тех же соединений, но на другой колонке

или относительно соответствующих характеристик в тонкослойной хроматографии, например, $\lg[(1-R_f)/R_f]$, и при этом обычно получают линейную зависимость.

При сопоставлении данных об удерживании веществ можно использовать значения коэффициента емкости k' , так как на него в отличие от t_R не влияют скорость подвижной фазы и геометрические особенности колонки.

Разделение на химически привязанной фазе аналогично разделению по методу распределительной хроматографии с аналогичными фазами, и поэтому данные по экстракции при равновесном состоянии могут быть использованы для предсказания времени удерживания.

Таблица 9.1. Групповые константы α_j для различных замещающих групп j в разных жидкостных хроматографических системах (значения указаны для замещения в ароматическом кольце)

Замещающая Группа	Адсорбционное разделение на силикогели	Распределительное разделение на обобщенной фазе вода – <i>n</i> -октанол	Разделение на обращенной химически привязанной фазе с отношением метанол – вода (1:1)
—Br	0.5	7.2	2
—Cl	0.15	5.1	
—F	0.7	1.4	1.9
—CH ₂	0.8	3.6	
—S—CH ₃	1.7	4.1	0.9
—O—CH ₃	2.1	1.0	
—NO ₂	2.3	0.5	0.7
—CN	3.7	0.3	0.5
—CHO	4.9	1.0	0.5
—CO ₂ CH ₃	5.2		1.1
—CO ₂ CH ₃	22	0.3	0.6
—COCH ₃	22	0.2	0.3
—OH	55	0.06	0.3
—NH ₂	200	0.50	0.1
—COOH	450		
—CONH ₂			

В ионообменной хроматографии на степень удерживания влияют три фактора: степень ионизации кислот и оснований, заряд ионизированной молекулы и способность вещества из водной подвижной фазы, используемой в ионообменной хроматографии, мигрировать в органическую фазу. Последнее зависит от молекулярной массы соединения и его гидрофобности. Следовательно, более сильные кислоты или основания сильнее удерживаются при анионообменном или катионообменном разделении. При снижении pK_a отдельной кислоты, входящей в образец, удерживание возрастает при разделении ряда кислот за счет анионного обмена, а при увеличении pK_a увеличивается удерживание оснований при их разделении за счет катионного обмена.

Таким образом, совпадение значений времени удерживания известного вещества с наблюдаемым дает возможность предположить их идентичность. Достоверность идентификации возрастает, если проводить сравнение хроматограмм известного вещества и неизвестного компонента в различных условиях. Если вещества в адсорбционной и обращенно-фазной или ионнообменной и эксклюзионной хроматографии ведут себя одинаково, надежность идентификации возрастает. Если достоверность идентификации при равенстве относительного удерживания составляет 90%, то при

изучении поведения этих же веществ в условиях существенно отличающихся достоверность идентификации составляет уже 99%.

Ценной характеристикой вещества, применяемой при идентификации, является отношение сигналов, полученных для данного вещества на двух разных детекторах. Анализируемое вещество после выхода из колонки проходит сначала через первый детектор, затем через второй, а сигналы, поступающие с детекторов, регистрируются одновременно при помощи многоперьевого самописца или на двух самописцах. Обычно применяют последовательное соединение ультрафиолетового детектора (более чувствительного, но селективного) с рефрактометром, или ультрафиолетового с детектором по флуоресценции, или двух ультрафиолетовых детекторов, работающих на разных длинах волн. Относительный отклик, т. е. отношение сигнала рефрактометра к сигналу фотометра, является характеристикой вещества при условии, что оба детектора работают в своем линейном диапазоне; это проверяется введением различных количеств одного и того же вещества. Качественную информацию можно получить, работая на фотометрических детекторах, снабженных устройством для остановки потока (Stop flow) и позволяющих регистрировать спектр выходящего из колонки пика, пока он находится в проточной кювете, сравнивая его со спектром известного соединения.

Значительный интерес при идентификации представляют современные, пока еще дорогие, спектрофотометры с диодной решеткой.

Совершенно неизвестное вещество невозможно идентифицировать только с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, необходимы и другие методы.

9.1. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВЕЩЕСТВ НЕХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

В некоторых случаях идентификация неизвестного вещества может быть обеспечена сбором фракции, соответствующей пику хроматографического разделения, и последующим анализом этой фракции физическими или химическими методами. При этом подвижная и неподвижная хроматографические фазы должны быть очищенными, чтобы фон от фазы был сведен к минимуму, они не должны вступать в химическую реакцию с растворенным веществом, должны быть совместимыми с хроматографической системой, используемой для разделения и обнаружения пика. Неподвижная фаза не должна выноситься из колонки. Кроме того, обе фазы не должны мешать идентификации вспомогательными методами и быть летучими, чтобы их можно было легко удалить выпариванием, фракции обычно собирают вручную, хотя возможно применение коллектора фракций. Для обеспечения чистоты, соответствующей пику собираемой фракции, внутренний объем трубки между детектором и выходом канала для сбора фракций должен быть минимальным. Этот объем должен быть измерен и внесены поправки на задержку между регистрацией пика детектором и фактическим выходом пика из канала для сбора фракций. Фракции удобно собирать в чистые, сухие, защищенные от попадания света сосуды с навинчивающимися крышками и тефлоновыми прокладками во избежание загрязнений. Возможен барботаж этих фракций чистым азотом или гелием. Растворители удаляют из образца выпариванием, продувкой газом, нагреванием ИК-лампой. Воду и смеси органических растворителей с водой удаляют выпариванием или лиофильной сушкой. Летучие буферные соединения удаляют при повышенных температурах.

Масс-спектрометрия — наиболее надежный и полный метод определения структуры вещества, молекулярной массы, его химической формулы. Этот высокочувствительный метод позволяет работать всего с 0,005 мкг вещества и установить как фрагментарный состав молекулы, так и ее элементное строение.

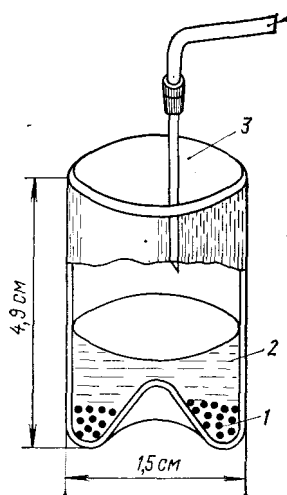
Рассмотрение идентификации неизвестных веществ с помощью масс-спектрометрии не входит в задачу данного издания. Следует отметить, однако, что большинство неионных, даже относительно малолетучих веществ удается проанализировать, используя обычно применяемый в масс-спектрометрии метод возбуждения

электронным ударом. Нелетучие или ионные соединения определяют при использовании методов химической ионизации, полевой десорбции и других специальных приемов.

Образец, предварительно упаренный до 1—2 капель (объем 25—50 мкл), переносят микрошприцем во входной зонд масс-спектрометра, медленно выпаривают и анализируют. При этом необходимо выполнять холостые опыты, отбирая аналогичную фракцию до выхода интересующего нас пика, упаривая ее и вводя в масс-спектрограф, чтобы убедиться в отсутствии фоновых примесей, которые могут дать значительные пики и мешать правильной идентификации.

Для спектрального анализа в инфракрасной области требуется относительно небольшая проба — 5 мкг в твердом виде и 50 мкг в растворе. Чувствительность повышается при использовании методов, основанных на преобразовании Фурье, при этом достаточно всего 0,05 мкг пробы. Этот метод анализа прекрасно дополняет данные, полученные на масс-спектрометре, и дает информацию о функциональных группах, а иногда и о структуре вещества. Имеется несколько приемов, позволяющих анализировать разделенные на хроматографе вещества с помощью ИК-спектрофотометра. Наиболее простым является концентрирование на таблетке КВч. Собранную с хроматографа и упаренную до 1—2 капель фракцию наносят микрошприцем на 5—10 мг порошка бромида калия, причем каждую новую порцию раствора выпаривают на таблетке, пропуская сухой ток инертного газа.

Рис. 9.1. Сосуд для концентрирования образца на микротаблетке КВч для спектрального анализа:



1 — КВч; 2 — собранная фракция; 3 — игла для подкожных инъекций; 4 — подача сухого азота

Другой путь состоит в выпаривании всей собранной фракции в сосуде с выпуклым дном (рис. 9.1), на котором находится порошок бромида калия. Растворитель полностью удаляют, а порошок бромида калия перемешивают и спрессовывают в микротаблетку. Таблетку из бромида калия можно непосредственно перенести в зону масс-спектрометр или в ИК-спектрофотометр. Можно вводить концентрированную фракцию в микрокювету спектрофотометра и сканировать, используя компенсирующий растворитель. Метод, основанный на преобразовании Фурье, дает довольно высокую чувствительность.

Применяют метод анализа в ИК-области с использованием комбинационного рассеяния. Растворитель, содержащий вещество, выпаривают на специальной пластинке, на которой остается тонкая пленка, после чего снимают спектральную характеристику. И здесь для повышения чувствительности желательно иметь прибор с преобразователем Фурье.

Для идентификации хроматографических пиков можно использовать спектры, определяющие структуры, содержащие ^1H , ^{11}B , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P . Хотя для спектров ЯМР требуется большое количество образца (до 1000 мкг), при применении методов,

основанных на преобразовании Фурье, значительно повышается чувствительность, так как многократное сканирование улучшает отношение сигнала к шуму и позволяет работать с малыми (до 5 мкг) количествами образца. Растворитель удаляют из хроматографической фракции полностью и заменяют его подходящим для ЯМР растворителем.

Из других методов идентификации следует отметить элементный анализ, требующий от 200 до 1000 мкг вещества, полярографию (0,01 мкг вещества), спектрофлуориметрию-, (0,05 мкг вещества) и, наконец, спектральный анализ в УФ- и видимой областях (0,1 мкг).

Простым, надежным и удобным способом определения функциональных групп являются цветные селективные реакции, для которых требуется всего 0,1 мкг вещества. Совпадение времени удерживания и соответствующая цветная реакция являются надежным подтверждением правильности структуры. Иногда достаточно растворитель, применяемый в жидкостной хроматографии, лишь частично упарить, а в некоторых случаях его следует полностью заменить подходящим растворителем. В табл. 9.2 приведены примеры цветных реакций для опознавания функциональных групп.

Таблица 9.2. Качественные реакции определения функциональных групп

Тип вещества	Реактив	Приобретенный цвет	Предел обнаружения, мкг	Обнаруживаемые вещества
Спирты	Бихромат калия, азотная кислота	Голубой	20	C1—C8
	Нитрат церия	Янтарный	100	C1—C8
Альдегиды	2,4-Динитрофенол	Желтый	20	C1—C6
	Реактив Шиффа	Розовый	50	C1—C6
Кетоны	2,4-Динитрофенол	Желтый осадок	20	C3—C8
Эфиры	Гидроксамат железа	Красный	40	C1—C5
Меркаптаны	Нитропруссид натрия	Красный	50	C1—C9
	Изатин	Зеленый	100	C1—C9
	Ацетат свинца	Желтый осадок	100	C1—C9
Сульфиды	Нитропруссид натрия	Красный	50	C2—C12
Дисульфиды	Нитропруссид натрия	Красный	50	C2—C6
	Изатин	Зеленый	100	C2—C6
Амины	Реактив Гинзберга	Оранжевый	100	C1—C4
	Нитропруссид натрия	Красный, голубой	50	C1—C4
Нитрилы	Гидроксамат железа — пропиленгликоль	Красный	40	C2—C5
Ароматические соединения	Формальдегид, серная кислота	Бордовый	20	C6H5—C6H4—C4
Алифатические непредельные соединения	То же	Бордовый	40	C2—C8
Галогеналкилы	Спиртовый раствор AgNO ₃	Белый осадок	20	C1—C5

9.2. СПЕКТРАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ НЕПОСРЕДСТВЕННО В ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ

Разработаны комплексные автоматизированные системы, позволяющие вводить вещество после разделения в колонке хроматографа непосредственно в спектрофотометр, но подобное оборудование является довольно дорогостоящим, требует значительной подготовки оператора и имеет ряд ограничений. Для многих задач применение таких систем нецелесообразно, а иногда даже непригодно.

Как и в случае газовой хроматографии существует несколько систем сопряжения с масс-спектрометром. Эти системы, естественно, должны обеспечивать эффективный перенос пика растворенного вещества, иметь высокую чувствительность при степени извлечения образца более 30% и давать возможность выбора нужного вида жидкостной хроматографии и режима работы масс-спектрометра. Такая система должна гарантировать быстрый, надежный анализ при минимальных требованиях к подготовке оператора. Необходимо также обеспечить возможность быстрого и полного удаления растворителя, примененного в качестве подвижной фазы; наконец, перенос пика должен быть воспроизводимым.

Возможно подключение к жидкостному хроматографу ИК-спектрометра с преобразователем Фурье. При этом химическая структура веществ, соответствующих пикам на хроматограмме, может быть идентифицирована с помощью данных, записанных в библиотеку спектральной информации системы.

ГЛАВА 10

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Количественная жидкостная хроматография является хорошо разработанным аналитическим методом, не уступающим по точности количественной газовой хроматографии и значительно превышающим точность ТСХ или электрофореза. К сожалению, в ВЭЖХ не существует детектора, который имел бы близкую чувствительность для соединений различного химического строения (как катарометр в ГЖХ). Поэтому для получения количественных результатов калибровка прибора обязательна.

Количественный анализ состоит из следующих стадий: 1) хроматографическое разделение; 2) измерение площадей или высот пика; 3) расчет количественного состава смеси на основании хроматографических данных; 4) интерпретация полученных результатов, т. е. статистическая обработка. Рассмотрим все эти стадии.

10.1. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ

При отборе пробы могут быть допущены ошибки. Особенно важно избежать ошибки и отобрать адекватную представительную пробу неоднородных твердых образцов, легколетучих или неустойчивых веществ, а также сельскохозяйственных продуктов и биоматериалов. Неоднородные образцы, например, пищевых продуктов, тщательно перемешивают и квартуют. Проводя эту операцию многократно, добиваются однородности пробы.

Погрешности и потери веществ могут быть допущены на стадии экстракции, выделения, очистки и т.д.

Образцы должны быть полностью растворены, а их растворы приготовлены с точностью $\pm 0,1\%$. Растворять образец желательно в подвижной фазе, что исключит возможность осаждения его после введения в хроматограф. Если растворение в подвижной фазе невозможно, то следует применять растворитель, смешивающийся с ней, и вводить в хроматограф объемы образца (менее 25 мкл).

Значительные погрешности могут быть при вводе пробы за счет ее фракционирования, утечек и размывания пиков. Размывание пиков вызывает образование хвостов, приводящих к частичному перекрытию пиков, и как следствие этого к погрешностям при детектировании. Для ввода пробы при количественном анализе предпочтительнее использовать петлевые клапанные устройства, а не шприцы из-за более высокой точности и меньшей зависимости от индивидуальных особенностей операторов.

При хроматографическом разделении веществ также могут возникнуть осложнения, приводящие к искажению данных количественного анализа. Возможно разложение или превращение пробы во время хроматографического процесса или необратимая адсорбция вещества на данной колонке. Важно убедиться в отсутствии этих нежелательных явлений и при необходимости провести регенерацию колонки или заменить ее. Перекрытие пиков и образование хвостов также можно уменьшить, изменяя условия хроматографирования.

Нельзя использовать в количественном анализе пики ложные или нечеткой формы, а также пики, время выхода которых близко к t_0 , поскольку возможно недостаточное их разделение. Обычно используют пики со значением $k' \geq 0,5$. Наивысшая эффективность колонки достигается при введении 10^{-5} — 10^{-6} г растворенного вещества на 1 г сорбента. При введении больших количеств образца зависимость высоты пика от нагрузки может оказаться нелинейной и потребоваться количественная оценка по площадям пиков.

К существенному искажению результатов хроматографического разделения приводят погрешности, связанные с детектированием, или усилением. Каждый детектор характеризуется специфичностью, линейностью и чувствительностью. Особенно важна проверка на селективность при анализе микропримесей. Отклик УФ-детекторов может изменяться на вещества со схожими функциональными группами в 10^4 раз. Необходимо отклик детектора прокалибровать для каждого определяемого вещества. Естественно, что вещества, не поглощающие в УФ-области, не дадут сигнала на самописец при использовании в качестве детектора фотометра. При использовании рефрактометра возможно появление отрицательных пиков. Кроме того, этот детектор необходимо термостатировать, чего не требуется для УФ-детектора.

Рис. 10.1. Измерение высоты пика

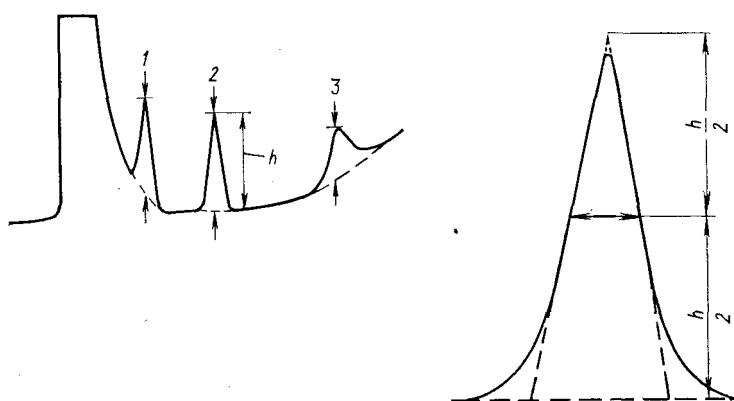


Рис. 10.2. Измерение площади пика

Линейностью детектора определяется размер вводимой пробы. Необходимо помнить, что скорость потока через колонку, температура колонки и детектора, а также его конструкция влияют на точность количественного анализа. Погрешности при передаче электрического сигнала на выходное устройство (самописец), интегратор или

на ЭВМ могут возникать за счет явочки шумов, отсутствия заземления, колебания напряжения в сети и т.д.

10.2. ИЗМЕРЕНИЕ ПЛОЩАДЕЙ ИЛИ ВЫСОТ ПИКОВ

Высотой пик h (рис. 10.1) называют расстояние от вершины пика до базовой линии, его измеряют линейной либо подсчитывают число делений на самописце. Некоторые электронные интеграторы и вычислительные машины дают информацию о высоте пиков. Положение базовой линии смещенных пиков находят путем интерполирования значений ординат, соответствующих началу и концу пика (пик 1 и 3 см. рис. 10.1). Для повышения точности необходимо иметь пологую стабильную базовую линию. В случае неразделенных пиков базовую линию строят между началом и концом пика, а не заменяют нулевой линией. Так как высота пиков менее зависит от влияния соседних перекрывающихся пиков, оценка по высоте пика точнее, и ее почти всегда используют при анализе микропримесей.

Площадь пика можно определять различными способами. Рассмотрим некоторые из них.

1. Планиметрический метод заключается в том, что пик обводят ручным планиметром, представляющим собой прибор механически определяющий площадь пика. Метод точен, но трудоемок и плохо воспроизводим. Применение этого метода нежелательно.
2. Метод бумажных силуэтов — пик вырезают и взвешивают. Метод хорошо воспроизводим, но трудоемок, при этом уничтожается хроматограмма. Применимость его зависит от однородности диаграммной ленты. Метод также не может быть широко рекомендован.
3. Метод вычисления произведения высоты пика на ширину на уровне половины высоты его применяют при четко очерченных и симметричных пиках. Базовую линию строят так же, как и при измерении высоты пика (рис. 10.2). Для более точного определения основания на уровне половины высоты можно увеличить скорость диаграммной ленты или применить микроскоп с миллиметровой сеткой. Ширину лучше измерять от внутренней границы одной линии до наружной границы другой. Для асимметричных пиков метод становится менее точным, так как ширина на уровне половины высоты может и не равняться половине основания.
4. Метод триангуляции состоит в построении треугольника путем проведения касательных к сторонам пика. Вершина треугольника находится выше, чем вершина пика. Увеличение площади, образованной этой продленной вершиной, будет последовательным для всей хроматограммы и не слишком повлияет на точность. Кроме того, некоторая площадь, теряемая при проведении касательных, будет компенсирована. Основание треугольника определяют пересечением касательных с базовой линией, а площадь — произведением $1/2$ основания на высоту. Для определения площадей асимметричных пиков этот метод наилучший. Однако воспроизводимость при построении касательных различными операторами различна и, следовательно, низкая.
5. Метод с применением дискового интегратора основан на электромеханическом приспособлении, присоединенном к самописцу. Перо, прикрепленное к интегратору, перемещается по полосе внизу ленты со скоростью, пропорциональной перемещению пера самописца.

Как и при ручном измерении, пик должен оставаться на шкале самописца, однако регулировки, компенсирующие смещение базовой линии и неполное разделение смежных пиков, снижает надежность и увеличивает продолжительность анализа.

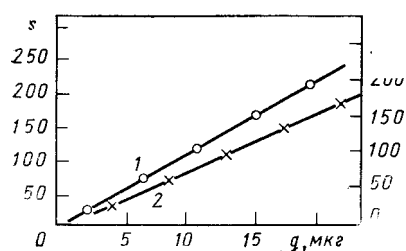
Метод более точен, чем ручные методы измерения, особенно при асимметричных пиках, и дает преимущество в скорости. Кроме того, он обеспечивает постоянную количественную запись анализа.

6. Методы с применением электронных интеграторов, определяющих площадь пиков и печатающих информацию об этой площади и о временах удерживания, могут включать коррекцию смещения базовой линии и определять площадь лишь частично разделенных

пиков. Основные преимущества—точность» скорость, независимость действия от работы самописца. Интеграторы имеют память, и их можно программировать для конкретного анализа, используя предварительно заложенную программу. К достоинствам интегратора относят его способность использовать поправочные коэффициенты на отклик детектора при пересчете исходных данных о площадях пиков, компенсируя различие чувствительности детектора к разным веществам. Подобные системы экономят время, улучшают аналитическую точность и полезны для рутинного аналитического анализа.

7. В жидкостной хроматографии широко применяют ЭВМ, измеряющие площади пиков. Они выводят на печать полное сообщение, включая название веществ, площади пиков, времена удерживания, поправочные коэффициенты на отклик детектора и содержание (в масс.%) для различных компонентов образца.

Рис. 10.3. Калибровочный график для не-250 тода внешнего стандарта:



1 — высота пика; 2 — площадь пика

10.3. РАСЧЕТ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА СМЕСЕЙ (МЕТОДЫ КАЛИБРОВКИ)

Метод внешнего стандарта или абсолютной калибровки. Вводят в хроматограф определенный объем каждого стандартного раствора и измеряют площадь или высоту пика. Для каждого вещества строят график зависимости высоты или площади пика от концентрации или массы. Если калибровочный график линейен и проходит через начало координат, калибровочный коэффициент S , получаемый в виде отношения высоты (площади) пика к его концентрации или массе, является тангенсом угла наклона калибровочного графика (рис. 10.3). Для неизвестного образца содержание вещества x (в мкг) определяют из соотношения

$$x = h_x / S,$$

где h_x — высота пика интересующего компонента, мм.

Концентрацию x_1 [% (масс.)] в исходном образце определяют по уравнению

$$X = \frac{(V / V_1) 10^{-4}}{G}$$

где V — объем образца, мл; V_1 — объем введенной пробы, мл; g — масса образца, г.

Обычно калибровочные графики линейны и экстраполируются через начало координат. В редких случаях, когда графики нелинейны, концентрацию в неизвестном образце определяют непосредственно по наилучшей кривой, проходящей через калибровочные точки. Калибровочную кривую необходимо проверять перед каждым анализом.

При анализе микропримесей желателно хроматографировать контрольные образцы, не содержащие интересующих компонентов.

Основной источник погрешностей такой калибровки—введение образца. Точность анализа значительно повышается при использовании петлевых дозаторов.

Метод нормировки—метод калибровки по размерам пиков, широко применяемый в ГЖХ, обычно реже используют в ВЭЖХ. Метод основан на измерении площади или высоты каждого пика в хроматограмме и вычислении содержания (в %) каждого компонента, пропорционального суммарной площади или высоте. Содержание всех компонентов принимают равным 100%. В жидкостной хроматографии такой подход используют после определения поправочных коэффициентов на отклик детектора для каждого вещества и после умножения площади пика на соответствующий коэффициент, чтобы учитывать различные значения для каждого компонента смеси. Цифровые интеграторы и ЭВМ обчисляют пики на хроматограмме по принципу нормировки. В память интегратора можно вводить коррекцию на нелинейность детектора по отношению к каждому компоненту. Метод нормировки применим и в том случае, когда надо количественно определить все компоненты смеси, что затруднительно при использовании метода абсолютной калибровки.

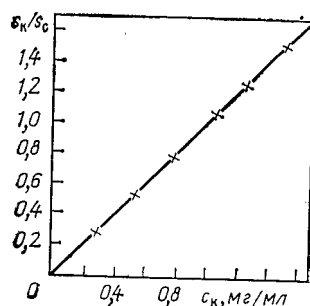
Метод внутреннего стандарта. Этот метод известен также под названием относительной или косвенной калибровки. Метод основан на добавлении внутреннего стандарта — вещества с известной концентрацией, не присутствующего в первоначальной смеси, в неизвестный образец для получения отдельного пика на хроматограмме и компенсации различных аналитических ошибок.

Таким образом, известное вещество играет роль внутреннего маркера и компенсирует небольшие отклонения параметров разделения на размер пиков. При хроматографировании специально приготовленных смесей с известным массовым соотношением анализируемого вещества и стандарта минимальная погрешность метода составляет 0,1%.

При использовании метода возможно исключение аппаратных и методических погрешностей. Добавление внутреннего стандарта до ввода пробы в колонку позволяет скомпенсировать погрешности, связанные с подготовкой пробы к анализу или получением производных интересующих соединений. Однако погрешность метода внутреннего стандарта выше, чем метода внешнего стандарта, так как измеряют размеры двух пиков (отношение пиков), а не одного.

Внутренний стандарт должен быть химически инертным, полностью отделяться от других компонентов смеси, концентрация его должна быть близка к концентрации определяемых веществ. Внутренний стандарт должен быть по возможности аналогичен по структуре определяемым веществам. При таком подходе потеря интересующего нас соединения будет сопровождаться потерей эквивалентной части стандарта.

Рис. 10.4. Калибровочный график для метода внутреннего стандарта



Калибровку с использованием внутреннего стандарта проводят при хроматографировании смесей, содержащих внутренний стандарт в постоянной концентрации, а интересующий компонент в разных концентрациях. Измерив площади или высоты

определяемых соединений, строят график отношений их к площади или высоте внутреннего стандарта в зависимости от концентрации интересующего компонента. При правильной калибровке график линеен и проходит через начало координат.

Пример калибровки по внутреннему стандарту приведен на рис. 10.4. Внутренний стандарт должен вноситься в такой концентрации, чтобы отношение высот h или площадей s пиков стандартов и компонентов было равно ≈ 1 . При разделении многокомпонентных смесей для достижения наивысшей точности может потребоваться несколько внутренних стандартов. Внутренний стандарт должен иметь с анализируемым веществом сходное значение k' , аналогичные растворимость и отклик детектора. Когда трудно найти достаточно близкий аналог-гомолог или изомер, стараются подобрать вещество с одинаковыми растворимостью и откликом детектора.

Точные количественные измерения проводят в изократическом режиме. Градиентное элюирование применяют, когда провести изократическое разделение невозможно. Хотя при градиентном режиме получают воспроизводимые результаты, но при градиентном элюировании иногда наблюдается смещение базовой линии и появление ложных пиков из-за наличия в растворителях воды. Кроме того, градиентное элюирование удлиняет время анализа. При количественном анализе в режиме градиентного элюирования необходимо тщательно контролировать скорость потока, если измеряют площади пиков, и соблюдать постоянство градиентного изменения состава подвижной фазы, если измеряют высоты пиков. Для анализа смесей компонентов, характеризующихся широким диапазоном значений k' , предпочтение следует отдавать изократическому разделению с переключением колонок, а не градиентному.

10.4. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

При проведении многократных анализов необходимо быть уверенным в достоверности результатов. Количественные измерения характеризуются точностью и воспроизводимостью результатов. Точность характеризуется разностью (погрешностью) между истинной и измеренной величинами и может быть определена в том случае, если известно точное значение измеряемой величины. Погрешности бывают детерминированные (систематические) и случайные (недетерминированные). Систематические погрешности можно учесть, и вводя поправочные коэффициенты, увеличить точность анализа. В ВЭЖХ систематические погрешности получают при взятии неправильной пробы, перекрывании пиков, нелинейности детектора или различной чувствительности его к разным веществам, при расчетах, и вообще при работе оператора, что связано с индивидуальными особенностями исследователя. Небольшие систематические погрешности позволяют иметь высокую точность анализа.

Недетерминированные погрешности случайны, присущи лишь данному методу анализа. Их можно уменьшить, но нельзя исключить. Можно достигнуть высокой воспроизводимости при небольших случайных погрешностях, распределение которых обычно соответствует кривой нормального распределения вероятностей. Мерой воспроизводимости результатов является стандартное или среднее квадратическое отклонение.

Стандартное отклонение S характеризует воспроизводимость и позволяет оценить дисперсию и доверительный интервал. Его определяют по формуле

$$s = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{N - 1}},$$

где X_j —результат отдельного измерения; \bar{X} —среднее арифметическое всех измерений; N — число измерений.

Относительную стандартную погрешность или относительное стандартное отклонение C вычисляют по формуле

$$C = (S/X)100$$

Дисперсия равна квадрату стандартного отклонения S^2 .

Доверительный интервал определяет достоверность анализа и является интервалом колебаний значений среднего арифметического, в котором с заданной вероятностью будут оставаться результаты последующих анализов.

Если доверительный интервал при заданной доверительной вероятности 90% равен $\pm 0,2$, это означает, что 90% результатов всех анализов из этой пробы будут отличаться от среднего арифметического не более чем на $\pm 0,2$. Доверительный интервал D рассчитывают по формуле

$$\Delta = \pm St / \sqrt{N},$$

где t — величина, взятая из табл. 10.1 для требуемого коэффициента надежности (доверительной вероятности) при определенном числе измерений.

При доверительной вероятности 90% и восьми определениях находим в табл. 10.1, что $t=1,94$. Если среднее арифметическое $X=5,00$, а стандартное отклонение $S=0,20$, то доверительный интервал (Δ) равен $\pm 0,14$. Следовательно, на 90% можно быть уверенным в том, что значение среднего арифметического ($X \pm \Delta$) будет находиться в интервале от 4,86 до 5,14.

Таблица 10.1. t -Распределение

Доверительная вероятность	Значения t при числе наблюдений						
	2	3	4	5	6	8	10
99	62,66	9,93	5,84	4,60	4,03	3,50	3,25
95	12,71	4,30	3,18	2,78	2,57	2,27	2,26
90	6,31	2,92	2,13	2,02	2,02	1,94	1,83

ГЛАВА 11

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНИКИ ЭКСПЕРИМЕНТА В ВЭЖХ

Специалисты, начинающие осваивать метод ВЭЖХ, часто недооценивают важности отдельных экспериментальных и методических деталей ВЭЖХ, которые почти не освещены в монографиях по жидкостной хроматографии.

В данной главе подробно рассмотрены некоторые проблемы, имеющие существенное значение в практической работе, и наиболее типичные ошибки начинающих.

11.1. СБОРКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

Для получения наиболее эффективной хроматографической системы необходимо разумно выбрать отдельные компоненты и их сочетание (см. гл. 8), и соединить их в соответствии с блок-схемой прибора (см. рис. 8.1). Ниже описаны особенности

соединительных элементов, применяемых в ВЭЖХ, и даны рекомендации по сборке системы. Многие из них относятся и к эксплуатации комплектных приборов.

Жидкостной тракт хроматографа разделяется на некритическую и критическую области. В последнюю входят компоненты от узла ввода до детектора включительно. В этой области к мертвому объему системы предъявляются исключительно жесткие требования, так как даже небольшое его увеличение вызывает заметное размывание хроматографической зоны.

В некритической области уменьшение объема системы имеет существенное значение в случае градиентного элюирования; в изократическом режиме этот параметр влияет лишь на расход растворителя при его замене.

11.1.1. Соединительные линии

Соединительные линии обычно изготавливают из стальных инерционных трубок с наружным диаметром 1,6 мм (1/16 дюйма); характеристики трубок приведены ниже:

Внутренний диаметр:

мм	0,10	0,18	0,20	0,25*	0,30	0,40	0,50*	0,76*	1,00
дюйм	0,004	0,007		0,01	0,012		0,02	0,03	0,04
Вместимость на 1 см длины, мкл	0,08	0,25	0,31	0,51	0,79	1,26	2,03	4,56	8,10

* Наиболее употребляемый размер

В ВЭЖХ каждый типоразмер капилляра имеет свое назначение. Трубки с внутренним диаметром менее 0,2 мм легко забиваются, поэтому их используют только там, где это действительно необходимо, например, в микроколоночной хроматографии.

В некритической области для уменьшения сопротивления соединительные линии высокого давления выполняют из капилляра с внутренним диаметром 0,5—0,76 мм. Для заборной линии, расположенной между сосудом с растворителем и насосом, лучше всего использовать трубку с наружным диаметром 3,1 мм (1/8 дюйма) и внутренним диаметром около 2 мм, изготовленную из полупрозрачного фторопласта, что позволяет контролировать образование пузырьков в подвижной фазе.

Длина трубок, расположенных в некритической области, принципиального значения не имеет.

В критической области, где соединительные линии вносят вклад во внеколоночное размывание зоны, для всех соединений используют отрезки капилляра с внутренним диаметром $\leq 0,25$ мм.

В препаративной хроматографии скорость потока подвижной фазы значительно выше, чем в аналитическом варианте; поэтому для снижения перепада давления внутренний диаметр соединительных линий увеличивают до 0,5—0,76 мм.

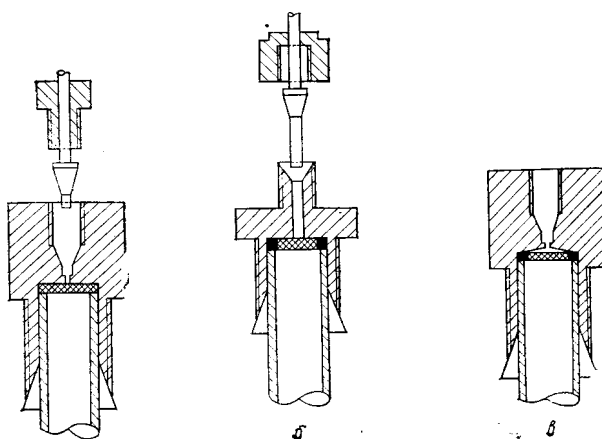
Капилляры с внутренним диаметром от 0,25 до 1 мм используют также для изготовления дозирующих петель к кранам-дозаторам. Для получения определенной вместимости петли лучше использовать более длинные капилляры с меньшим внутренним диаметром; в этом случае размывание хроматографической зоны меньше. Из практических соображений обычно ограничиваются длиной петли до 20—25 см. В эксклюзионной хроматографии полимеров обычно применяют петли с внутренним диаметром не менее 0,5 мм, так как дозируемые растворы имеют относительно высокую вязкость.

11.1.2. Соединители и уплотняющие муфты

На рис. 11.1 на примере концевых соединений колонок показано два типа соединений металлических линий, применяемых в ВЭЖХ. Тип «б» имеет наружную

нажимную гайку, а тип «а»—внутреннюю, или компрессионную. Концевые соединители колонок независимо от типа нажимной гайки имеют разный мертвый объем. В соединителях с малым мертвым объемом (рис. 11.1,а) торец капилляра упирается в специально обработанную плоскость присоединяемой детали соосно с выполненным в ней отверстием и фиксируется в данном положении резьбовым соединением с уплотняющей муфтой, которая обжимается на капилляре. Эти соединители обозначают аббревиатурой LDV (Low dead Volume). На рис. 11.1,б показан соединитель с нулевым мертвым объемом, или ZDV (Zero dead Volume). Капилляр в нем проходит через сквозное сверление и упирается непосредственно в плоскость пористого фильтра. В соединителях типа LDV пористый фильтр колонки полностью прижат к плоскости детали, и поток растворителя поступает практически в одну точку фильтра. Накопление нерастворимых загрязнений в этой точке приводит к забиванию фильтра и росту давления, хотя остальная поверхность фильтра остается чистой. Для оптимизации распределения потока и активного использования всей поверхности фильтра наиболее современные конструкции концевых соединителей колонок снабжены распределительным конусом с углом относительно плоскости 10° (рис. 11,1 в).

Рис. 11.1. Концевые соединители колонок.



а — соединитель с малым мертвым объемом, компрессионной гайкой и фильтром обычного типа;
 б — соединитель с нулевым мертвым объемом, наружной гайкой и фильтром, запрессованным в Кел Ф; в — соединитель с малым мертвым объемом и распределительным конусом

Фильтры колонок представляют собой диски из пористой нержавеющей стали толщиной от 0,5 до 1,6 мм с размером пор $0,5\text{—}10\text{ мкм}$. Размер пор должен быть в 2—5 раз меньше номинального размера частиц сорбента. Прочность фильтра возрастает с толщиной, но одновременно увеличивается и его мертвый объем. Наибольший вклад в размывание на пористом фильтре вносит кольцевая плохо промываемая зона, в которую упирается стенка колонки (рис. 11,1, а). Для устранения этой зоны фильтр колонки запрессовывают в кольцо из достаточно жесткого политрифторхлорэтилена «Кел Ф». Фильтры такой конструкции рекомендуется применять для достижения наивысшей эффективности колонок.

Практика работы с концевыми соединителями колонок типа ZDV показала, что они имеют больше недостатков, чем достоинств. Во-первых, при многократном демонтаже и монтаже колонки конец капилляра сминает пористый фильтр в точке контакта, что приводит к возрастанию сопротивления, а иногда и к полному прекращению потока через колонку; во-вторых, у этих соединителей заметно больший плохо промываемый объем в зазоре между стенками детали и капилляра (от конца последнего до уплотняющей муфты).

Соединители с наружной нажимной гайкой, которыми еще несколько лет назад оснащали почти все колонки, имеют большой плохо промываемый мертвый объем и

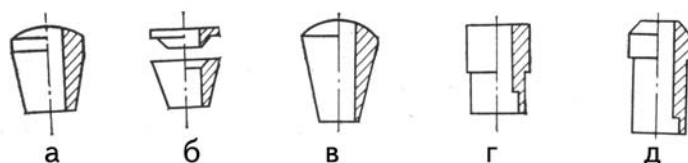
значительно легче деформируются, чем соединители с компрессионной гайкой; поэтому в последнее время их применяют гораздо реже.

Таким образом, можно считать, что наилучшими характеристиками обладают концевые соединители колонок типа LDV с внутренней нажимной гайкой и распределительным конусом. При установке концевого соединителя на колонку ее вставляют до упора в соединитель без пористого фильтра и обжимают уплотняющую муфту. Затем соединение разбирают, устанавливают на место фильтр и снова затягивают, избегая излишних усилий. Такой порядок операций обеспечивает надежное уплотнение торца колонки по плоскости фильтра.

Соединительные трубки, которыми соединяют отдельные компоненты в критической области хроматографа, представляют собой отрезки капилляров с внутренним диаметром $\leq 0,25$ мм и длиной около 5 см, на обоих концах которых расположены нажимные гайки с обжатыми муфтами, обеспечивающими герметичность соединения. Дальнейшее уменьшение длины нецелесообразно, так как при этом затрудняется сборка и разборка соединений.

В связи с тем, что в практической работе хроматографисту приходится иметь дело с различными системами уплотнений следует знать их особенности. На рис. 11.2 показаны уплотняющие муфты «Паркер», «Свейджлок», «Валко», «Реодайн» и SSI (Scientific System Inc.), наиболее часто используемые в ВЭЖХ. Эти муфты имеют разную форму, а муфта типа «Свейджлок» состоит из двух компонентов. Муфты первых трех типов в определенной степени взаимозаменяемы: геометрия внутреннего посадочного конуса в концевых соединителях колонок (и в большинстве других соединяемых деталей, например в корпусах выходных клапанов насосов) позволяет реализовать хорошее уплотнение с любой из этих муфт, хотя они имеют разную конусность. Однако это справедливо только при первом обжатии новой муфты.

Рис. 11.2. Уплотняющие муфты:



а — «Паркер»; б — «Свейджлок»; в — «Валко»;
г — «Реодайн»; д — «Сайентифик Систем» (SSI)

После обжатия муфты на капилляре этот конец соединителя можно использовать для присоединения к деталям только того типа, на котором была обжата муфта. Глубина сверления, в которое до упора входит конец капилляра, угол посадочного конуса, форма и размер муфт в различных типах уплотнений различаются. По этой причине сочетание разнотипных соединительных деталей с уже обжатыми муфтами часто приводит либо к увеличению мертвого объема, либо к плохому качеству уплотнения и деформации деталей.

Муфты типа «Реодайн» и SSI применяют только для соединения с компонентами, выпускаемыми этими фирмами, которые широко используют в комплектных хроматографах и самостоятельно собираемых системах (краны-дозаторы, запорные и переключающие краны, разнообразные фильтры, соединительные детали и т.д.).

Исключительно удобны в работе муфты типа «Паркер» и «Валко», изготовленные из полиимида с фирменным названием «Веспел». Эти муфты сохраняют герметичность при давлениях до 35 МПа и являются в полном смысле слова универсальными, так как они упруги, а после разборки соединения легко снимаются с капилляра, что позволяет многократно использовать их в уплотнениях любых типов, кроме SSI.

Чтобы избежать деформации уплотнительных элементов, необходимо проводить их затяжку очень аккуратно. Капилляр с надетой на него новой муфтой вводят до упора в отверстие соединяемой детали, закручивают нажимную гайку пальцами и подтягивают гаечным ключом на 1/2 оборота, удерживая деталь другим ключом. После этого включают насос и окончательную затяжку проводят до прекращения подтекания при постепенном увеличении давления с 0,5—1 МПа до рабочей величины.

Все рассмотренные типы соединений, кроме SSI, разработаны для обычных условий применения в промышленности и часто имеют дополнительное обозначение «CPI» (Chemical Process Industry). Резьбовые детали этих соединений для капиллярных трубок с наружным диаметром 1,6 мм деформируются при предельном моменте затяжки 7,5-8 Н•м (сравните: чтобы сломать скручиванием обычный карандаш, требуется усилие около 1,6-1,8 Н•м). Аналогичные детали фирмы SSI, разработанные специально для высоких давлений, значительно прочнее и деформируются при моменте затяжки около 20 Н•м.

Особая осторожность требуется при работе с муфтами из вспела, так как они гораздо легче деформируются. Муфты из фторопласта, которые иногда применяют для присоединения колонки к детектору, лучше затягивать только пальцами.

Иногда при сборке системы возникает необходимость соединения двух или более капиллярных трубок. Для этого используют соединители, имеющие два, три или четыре входа. Предпочтение следует отдавать соединителям с компрессионными гайками, у которых меньше мертвый объем.

В критической области нужно использовать соединители с диаметром сверления 0,25 мм, а в некритической—0,75—1 мм.

Разработаны новые типы соединителей для критической области (защищенное фирменное название «Direct Connect»), которые позволяют предельно минимизировать соответствующие мертвые объемы за счет удаления капиллярных трубок. Уплотняющие элементы в этих соединениях изготовлены из Кел Ф; они выдерживают давление до 35 МПа, надежно уплотняются пальцами без применения гаечных ключей и выпускаются в разных вариантах для сочетания с основными системами уплотнений, используемых в ВЭЖХ. Эти детали особенно необходимы для работы с высокоскоростными короткими колонками, заполненными сорбентами зернением 3 мкм, и с микронабивными колонками. Соединители, предназначенные для соединения двух колонок (в том числе присоединения защитных колонок обычного типа), а также для присоединения колонок непосредственно к кранам-дозаторам и детекторам некоторых типов, полностью изготовлены из Кел Ф, имеют длину около 25 мм и внутренний диаметр 0,3 мм. Испытания показали, что при соединении двух колонок длиной 10 см и внутренним диаметром 4,6 мм, набитых обращенно-фазным сорбентом С18 с диаметром зерна 3 мкм, суммарная эффективность равна сумме теоретических тарелок обеих колонок. Специальные предколонки типа «Direct Connect» имеют общую длину 5 см, внутренний диаметр 2,1 мм, длину рабочего слоя 3 см и сменные уплотняющие элементы для различных систем уплотнений. Влияние типа предколонки на эффективность системы видно из данных, приведенных в табл. 11.1.

Таблица 11.1. Эффективность системы в зависимости от типа пред колонки

Наполнитель и раз- мер аналитической колонки	N, т.т./м	Предколонка обычного типа		Предколонка «Direct Connect»	
		N, т.т./м	Потеря эффективности, %	N, т.т./м	Потеря эффективности, %
Адсорбосфер С18 (3 мкм), 100X4,6 мм	127700	97000	24,0	117700	7,7

Адсорбосфер С18 (5 мкм), 150X4,6 мм	100000	88100	11,9	96000	4,0
Сферисорб 10 (10 мкм), 250X4,6 мм	35100	32700	6,8	35000	0,3

11.1.3. Резка и обработка концов капиллярных трубок

Торцы капилляров, используемых для соединений в критической области, должны быть обрезаны строго под углом 90° и тщательно обработаны, иначе в месте соединения образуется плохо промываемый мертвый объем. На наружной и внутренней поверхности конца капилляра не должно быть заусенцев, а на торце—заметных рисок. Для резки капиллярных трубок и удаления заусенцев выпускаются специальные достаточно дорогие приспособления, однако при некотором навыке эти операции можно выполнять и без них.

Большинство начинающих хроматографистов даже не предполагает, насколько большую роль играет правильная обработка торца соединительного капилляра. Поэтому ниже подробно описана техника проведения этой работы.

1. Трубку выпрямляют, кладут на ровную поверхность и отмечают необходимую длину.
2. По метке, по возможности ровно, пропиливают трехгранным надфилем желобок по всей окружности трубки на глубину, зависящую от внутреннего диаметра капилляра. Так, если он равен 0,25 мм, то глубина пропила должна быть примерно 0,5—0,6 мм. Пропиливать следует постепенно, медленно вращая трубку.
3. Зажимают трубку с двух сторон пропила, возможно ближе к нему, двумя плоскогубцами и осторожно перегибают в ту и другую сторону, пока она не сломается.

Губки плоскогубцев должны быть покрыты относительно мягким материалом, например, обернуты двумя-тремя слоями алюминиевой или отожженной медной фольги. Нельзя сильно сжимать плоскогубцы, так как это может привести к деформации наружной поверхности капилляра, а в этом случае надеяться на хорошее качество уплотнения не приходится.

Стадию 2 можно осуществить другим способом. Выпрямленную трубку кладут на твердую ровную поверхность, ставят лезвие острого ножа из хорошо закаленной стали на метку и, сильно нажимая на нож с одновременным вращением трубки, нарезают на ней кольцевую канавку требуемой глубины. Далее поступают, как на стадии 3. При использовании этого способа отрез получается значительно более ровным, но часто уменьшается (завальцовывается) внутренний диаметр капилляра.

Отрезанная трубка имеет неровный торец с остатками лишнего металла. Для его удаления используют один из следующих способов.

1. Если трубка достаточно ровная, ее обматывают двумя-тремя слоями медной или алюминиевой фольги, вставляют как можно глубже в патрон электродрели и зажимают. Дрель фиксируют в неподвижном положении, включают и удаляют Лишний металл легкими прикосновениями мелкозернистого, абразивного бруска, смоченного водой.

Нержавеющая сталь очень пластична и легко затягивает отверстие капилляра. Чтобы этого не произошло, отверстие по мере необходимости прочищают специальным шабером, сделанным из победита в виде трехгранного надфиля с острым концом и гранями.

Грубые заусенцы на внешней стороне капилляра удаляют легкими прикосновениями абразива, расположенного под углом к оси капилляра.

2. Второй способ отличается тем, что лишний металл удаляют на электрическом точиле, а трубку держат в руках под углом 90° к абразивному кругу. Круг должен быть умеренно мелкозернистым, с ровной рабочей поверхностью.

Для контроля перпендикулярности торца капилляра можно использовать стеклянную трубку внутренним диаметром около 2 мм, на которой нанесена четкая кольцевая метка. Такую трубку можно, в частности, изготовить из пипетки вместимостью 0,25—0,5 мл. Капилляр вставляют в трубку и совмещают его торец с меткой. На просвет видно даже весьма незначительное отклонение плоскости торца от перпендикулярности. Окончательную доводку торца капилляра и устранение заусенцев с его наружной поверхности проводят шлифованием, например, с помощью мелкозернистого абразивного бруска (зернистость 2—5 мкм) с ровной поверхностью. Эту операцию выполняют на электродрели (как при грубой обработке) или вручную. При окончательном устранении заусенцев из отверстия капилляра надо быть очень осторожным, чтобы не увеличить его диаметр.

Для осмотра капилляра на всех стадиях его обработки рекомендуется использовать лупу с пятикратным увеличением.

Все новые капилляры перед применением нужно тщательно отмыть от загрязнений. Их по очереди промывают ацетоном, толуолом, изопропиловым спиртом и дистиллированной водой. Затем капилляры заполняют 50%-ной азотной кислотой, выдерживают 20 мин для пассивации металла, отмывают дистиллированной водой, ацетоном и сушат продувкой чистым сухим газом. Для промывок удобно использовать шприц на 2—5 мл, который соединяют с капилляром фторопластовой трубкой. Пассивация азотной кислотой повышает коррозионную стойкость нержавеющей стали к галогенид-ионам, поэтому при работе с соответствующими растворителями нужно время от времени пассивировать всю хроматографическую систему, сняв колонку и детали (если они есть), выполненные из материалов, разрушаемых азотной кислотой.

11.1.4. Особенности присоединения детектора

Внеколоночное размывание хроматографической полосы на участке от колонки до кюветы детектора сильно снижает эффективность разделения. В данной линии совершенно недопустимы плохо промываемые объемы (например, недостаточно чисто обработанные торцы капилляра), а ее длина должна быть минимальной.

Давление в хроматографической системе максимально на выходе из насоса и снижается почти до атмосферного на выходе из колонки. Соответственно падает и растворимость воздуха в подвижной фазе. При недостаточно тщательной дегазации он выделяется из подвижной фазы в виде пузырьков, которые при попадании в кювету детектора вызывают сильный шум и броски нулевой линии.

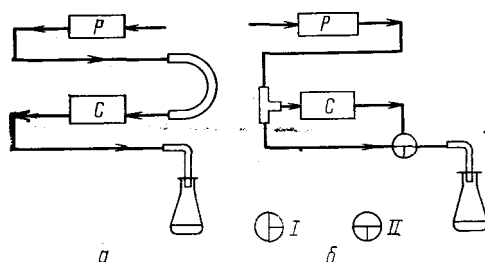
Чтобы предотвратить выделение пузырьков, в кювете создают повышенное давление (от 0,05 до 0,2 МПа), устанавливая на ее выходе какое-либо гидравлическое сопротивление. Обычно для этого достаточно 0,3—1 м капилляра с внутренним диаметром 0,25 мм. Не рекомендуется использовать специально сплюснутые отрезки капилляров, так как они гораздо легче засоряются, чем трубки с круглым сечением, а засорение выходной линии может привести к слишком высокому давлению в кювете и ее разрушению.

Лучше всего ставить на выходе из детектора фторопластовую трубку такого внутреннего диаметра, чтобы она умеренно плотно надевалась на капилляр, применяемый в качестве гидравлического сопротивления. Это соединение служит своего рода предохранительным клапаном: в случае засорения капилляра его просто выбьет из фторопластовой трубки.

При использовании детекторов, работающих по дифференциальной схеме, необходимо следить за тем, чтобы сравнительная кювета всегда была заполнена растворителем. При каждой замене подвижной фазы после того, как колонка полностью уравновешена с новым растворителем, кювету необходимо заполнить тем же растворителем. Для этого обычно соединяют выход рабочей и вход сравнительной кюветы короткой (8 — 12 см) фторопластовой трубкой, которую плотно надевают на соответствующие капилляры (рис. 11.3, а). Промывку ведут — 5 мин, затем присоединяют

выходную линию к выходу рабочей кюветы, а освободившийся конец фторопластовой соединительной трубки надевают на входной капилляр сравнительной кюветы, замыкая ее петлей.

Рис. 11.3. Схема соединения кювет детектора с замыканием сравнительной кюветы петлей (а) и с гидравлическим «поджимом» сравнительной кюветы (б):



P — рабочая кювета; С — сравнительная кювета; I — положение-трехходового крана при промывке сравнительной кюветы; II — рабочее положение крана

При работе с рефрактометрами, которые особенно чувствительны к пульсации давления, лучше использовать более сложную схему (рис. 11.3, б). Для промывки сравнительной кюветы трехходовой кран устанавливают в положение I, а после ее окончания переводят в рабочее положение II, запирая выход из кюветы сравнения. Все соединительные линии выполняют из фторопластовой трубки с внутренним диаметром около 1—1,5 мм для уменьшения их сопротивления.

При реализации этой схемы в отличие от предыдущей обе кюветы находятся под одним и тем же давлением, а незначительные остаточные пульсации дополнительно компенсируются, что заметно улучшает нулевую линию.

11.1.5. Запуск и герметизация системы

После сборки и проверки заземления узлов, питаемых электрическим током, проводят пробный запуск системы. Для заполнения насоса отсоединяют нагнетающую линию и засасывают шприцем растворитель через выходной клапан. Желательно устанавливать емкость с растворителем выше насоса, так как при этом облегчается работа всасывающего клапана. Ни в коем случае нельзя включать насос, если он не заполнен растворителем! К заполненному насосу присоединяют линию нагнетания, открывают промывочный кран, устанавливают расход 5 — 8 мл/мин и прокачивают систему до появления растворителя в сливной линии крана. Эту линию, конец которой опущен в сосуд с небольшим количеством растворителя ниже его уровня, желательно изготовить из полупрозрачного фторопласта, чтобы легче контролировать наличие пузырьков воздуха.

После удаления воздуха из системы уменьшают расход до 0,5 мл/мин, закрывают промывочный кран и подают растворитель до прекращения выхода воздуха из сливной линии на выходе детектора, одновременно наблюдая за давлением и при необходимости затягивая подтекающие соединения. Наличие течи устанавливают по смачиванию полоски фильтровальной бумаги, которую прикладывают к каждому соединению. Если давление стабилизировалось, нигде нет течи, а в сливной линии отсутствуют пузырьки воздуха, значит, система заполнена правильно, и можно приступить к работе.

Проскок пузырьков воздуха в сливной линии при хорошей Дегазации растворителя почти однозначно указывает на негерметичность системы. Воздух может засасываться за счет эжекции через незначительные неплотности, которые не дают видимой течи.

В таком случае нужно аккуратно и понемногу подтягивать все соединения. Если подтяжка не дает эффекта, приходится проверять герметичность отдельных элементов системы.

11.1.6. Типичные ошибки при сборке системы

Наиболее типичные ошибки при сборке хроматографической системы чаще всего обусловлены неверным выбором ее узлов и соединителей. Неожиданно низкая эффективность колонки при проверке в стандартных условиях почти всегда указывает на наличие большого мертвого объема какого-нибудь из компонентов в критической области.

Наиболее распространенной ошибкой является излишняя затяжка соединений, приводящая к деформации уплотнительных деталей. При использовании деформированных или разнотипных элементов заметно увеличивается мертвый объем системы и часто наблюдается трудноустраняемая течь. Попытка еще туже затянуть подтекающее уплотнение обычно приводит к его разрушению.

Фторопластовые муфты, неосторожно деформированные в соединительных каналах детектора, довольно трудно извлечь оттуда; остаток не полностью удаленной пластмассы при установке новой муфты часто забивает отверстие. Если это случилось на выходной линии детектора, то подтекание или разрушение кюветы практически неизбежно.

Иногда путают соединительные линии крана-дозатора или рабочей и сравнительной кювет детектора, а также направление потока растворителя через колонку.

Если оператор забыл вернуть систему в рабочее положение после промывки сравнительной кюветы, то пик вещества записывается в виде странного сигнала (вроде узкой синусоиды), расположенного по обе стороны базовой линии. После длительных поисков причин высокого уровня шумов детектора вдруг оказывается, что он не заземлен.

Подобные ошибки легко предотвратить, нужно только хорошо знать характеристики имеющихся в распоряжении компонентов и быть внимательным при выполнении всех необходимых операций при сборке системы.

11.2. ПОДГОТОВКА РАСТВОРИТЕЛЯ И ПРОБЫ

Способ подготовки растворителя для ВЭЖХ зависит от того, какого качества растворитель имеется в наличии и для решения каких задач предполагается его использовать. Имеет значение также устойчивость растворителя к действию тепла, света и кислорода воздуха.

Если используют растворители высокой чистоты, например перегнанные в стеклянной аппаратуре, специально очищенные для ВЭЖХ и профильтрованные через фильтр с порами диаметром 0,5 мкм, их подготовка для работы проста: готовят смесь растворителей нужного состава, как правило, смешением по объему и дегазируют ее тем или иным способом. Если используют растворитель более низкого качества, в особенности технический, его подвергают нескольким дополнительным стадиям очистки: перегонке или ректификации в стеклянной аппаратуре, часто с предварительной химической обработкой, осушкой и с обязательным фильтрованием перед дегазацией через фильтр с порами диаметром 0,2—0,5 мкм. Методики очистки некоторых растворителей приведены в разд. 6.5 или могут быть найдены в литературе.

Пригодность подготовленного растворителя проверяют непосредственно на хроматографе в диапазоне чувствительностей и расходов, с которыми предстоит работать. Недостаточную чистоту растворителя устанавливают по шумам нулевой линии, превышающим допустимые; по большому дрейфу нулевой линии; по невозможности установить нулевое положение пера самописца на чувствительных шкалах детектора.

Такая проверка особенно важна (нередко ежедневно или для каждой смены элюента) при работе в градиентном режиме, иногда необходимы растворители наиболее высокого качества.

11.2.1. Дегазация растворителя

Выделяющиеся из недегазированной подвижной фазы пузырьки воздуха приводят к нестабильности нулевой линии детектора, ухудшают эффективность колонок для эксклюзионной хроматографии, заполненных полужесткими гелями, могут вызвать окисление лабильных соединений и некоторых привитых фаз.

Дегазацию проводят одним из следующих способов: кипячением, продувкой гелием, воздействием вакуумом или ультразвуком.

Кипячение с обратным холодильником 5—10 мин очень эффективно для индивидуальных, но нежелательно для смешанных растворителей, содержащих компоненты со значительной разницей в температурах кипения. Дегазированный растворитель переносят в сосуд для подвижной фазы передавливанием или с помощью сифона. В обоих вариантах подающая трубка и должна почти упираться в дно сосуда, чтобы подача происходила под слой жидкости. Переливать растворитель через воронку не рекомендуется, так как при этом в нем снова растворяется некоторое количество воздуха. Лучше всего дегазацию проводить непосредственно в сосуде для подвижной фазы.

Дегазация продувкой гелием основана на низкой растворимости этого газа в жидкостях. При барботаже через слой растворителя он достаточно быстро захватывает и уносит из системы растворенный воздух. Простой вариант осуществления этого метода описан в разд. 8.6. Он особенно пригоден для работы с легко окисляющимися растворителями.

Для дегазации ультразвуком достаточно поместить сосуд с растворителем на 5—10 мин в ультразвуковую ванну, заполненную водой. Процесс протекает гораздо эффективнее, если сосуд подключить к источнику умеренного вакуума. Без применения вакуума данный способ наиболее целесообразно использовать для смеси растворителей с существенно различающейся летучестью, так как он практически не изменяет их состава.

Распространенным методом является дегазация растворителей под вакуумом. В сосуд с растворителем помещают магнитную мешалку, закрывают его пробкой с отводом, присоединяют к источнику умеренного вакуума $5 \cdot 10^3$ — $15 \cdot 10^3$ Па и дегазируют растворитель 3—5 мин, хорошо перемешивая. Если для создания вакуума используют водоструйный насос, то между ним и сосудом включают предохранительную склянку и трубку с осушителем. Перед установкой сосуда на хроматограф целесообразно продуть объем над дегазированным растворителем аргоном или азотом.

В данном разделе уместно отметить еще одно важное обстоятельство: почти во всех рассмотренных методах дегазации растворителя сосуд для подвижной фазы приходится отсоединять от хроматографической системы. При этом нужно вынуть из него трубку, на конце которой надет фильтр, и немедленно опустить фильтр в заранее приготовленный стакан с тем же растворителем. Если оставить фильтр на воздухе, то растворитель будет достаточно интенсивно испаряться с его пористой поверхности, что приведет к охлаждению фильтра и конденсации на нем атмосферной влаги. Кроме того, во внутреннюю полость фильтра при этом попадет воздух, который потом придется удалять из системы.

Разработаны новые дегазаторы, работающие по другому принципу. Растворитель из сосуда попадает в насос через находящуюся в вакуумированном пространстве трубку из полимера с полупроницаемыми стенками, пропускающими молекулы газа, но не пропускающими компоненты растворителя. Степень удаления газа составляет более 90%, состав растворителя при этом стабилен.

11.2.2. Особенности работы с водными растворителями

Вода и элюенты, готовящиеся на ее основе, нуждаются в особо внимательном отношении, так как вода очень легко загрязняется, поглощая газы и летучие вещества из воздуха лабораторного помещения. Некоторые водные растворы, особенно буферные фосфатные, являются питательной средой, в которой быстро размножаются многие бактерии, образуя частицы колоний. Эти частицы способны засорять фильтры, нарушать работу клапанов, портить колонки и т.д. Дегазированные водные растворы очень быстро поглощают кислород из воздуха. Следует, как правило, использовать для ВЭЖХ воду максимально высокой степени чистоты, получать ее непосредственно перед работой, готовить растворитель, дегазировать его, фильтровать и затем быстро использовать. Если растворитель стоял некоторое время, его нужно перед работой проверить на отсутствие взвесей и опалесценции, профильтровать и дегазировать. Лучше всего готовить и использовать растворитель в количестве, необходимом на день работы.

11.2.3. Подготовка раствора пробы

Раствор пробы, как правило, нужно готовить в том же растворителе, который используют для работы. Этот способ является наилучшим, так как не дает (или почти не дает) ложных пиков на хроматограмме, связанных с вытеснительными пиками, прохождением через детектор другого растворителя и откликом детектора на изменение при этом показателя преломления.

Если есть затруднения при растворении пробы, можно попытаться использовать для растворения один из компонентов рабочего растворителя, например, более полярный, а затем у добавить другие компоненты до получения требуемого состава. Можно ускорить или улучшить растворение, обработав пробу в ультразвуковой ванне. Можно применять и нагревание, но при этом всегда следует учитывать возможность выпадения осадка образца при охлаждении, изменения за счет этого состава раствора и результатов анализа.

Если в пробе присутствуют нерастворимые примеси (соли, полимеры и др.), анализ которых не представляет интереса, такие пробы после растворения должны быть профильтрованы через фильтр с порами 0,2—0,5 мкм под вакуумом или, что более удобно, под давлением; можно отделять твердые частицы на центрифуге. Использование специальных центрифужных пробирок для фильтрации, состоящих из двух частей, разделенных фильтром с порами 0,5 мкм, позволяет быстро отфильтровать пробу от осадка.

Если пробу не удастся приготовить из компонентов рабочего растворителя из-за плохой растворимости образца, следует попытаться подобрать растворители, используя литературные данные по растворимости или метод проб и ошибок. Когда растворитель выбран, всегда до того, как ввести приготовленный раствор пробы, сделайте холстой тестовой ввод такого же объема выбранного растворителя, но без растворенного образца. Это дает возможность оценить, какие ложные пики при вводе растворителя будут образовываться. Наконец, следует ввести раствор образца в этом растворителе. Если растворитель сильно отличается от того, который используют для элюирования, то кроме образования ложных пиков возможно выпадение части образца в осадок в колонке или инжекторе, когда проба смешивается с элюентом. Иногда при смешивании таких разных растворителей существенно падает эффективность разделения или возможно даже исчезновение пиков компонентов пробы.

11.2.4. Подготовка растворов полимерных образцов

Подготовка растворов полимеров для эксклюзионно-хроматографического анализа имеет свои особенности. Полимер можно растворять только в растворителе, используемом в качестве подвижной фазы, желательно в той же его партии, которую

применяют в данный момент. Это особенно важно, если полимер содержит низкомолекулярные компоненты (например, антиоксиданты), пики которых могут накладываться на пики примесей в растворителе, так как все они элюируются с объемом полного проникания.

Проблемы, связанные с влиянием массы, концентрации, объема и вязкости раствора образца на результаты эксклюзионно-хроматографического анализа полимеров рассмотрены в разд. 2.4.

Полимеры растворяются значительно медленнее низкомолекулярных соединений. В большинстве случаев растворение можно ускорить, умеренно нагревая раствор подогретым воздухом и одновременно перемешивая содержимое сосуда, не допуская закипания и улетучивания растворителя. Растворимость полимеров снижается по мере роста молекулярной массы. Нужно быть полностью уверенным в том, что в выбранных условиях анализа полимер растворяется целиком. Для этого необходимо, чтобы растворимость наиболее высокомолекулярных образцов была как минимум в 2—3 раза выше, чем рабочая концентрация раствора.

Синтетические полимеры часто содержат сшитые нерастворимые частицы (гель), которые не видны при рассматривании раствора на просвет. Эти частицы иногда можно обнаружить, наклоняя сосуд с раствором: прилипшие к стенке частицы достаточно хорошо заметны.

Вероятность присутствия нерастворимых частиц при анализе полимеров значительно выше, чем в случае анализа низкомолекулярных соединений, поэтому анализируемые растворы полимеров нужно обязательно фильтровать под давлением через фильтр с порами $\leq 0,5$ мкм.

Подготовка растворов и их ввод в кран-дозатор усложняются при работе с полимерами, для растворения которых требуется температура выше 50 °С. В этих случаях нужно принимать все необходимые меры, чтобы предотвратить или устранить выпадение полимера из раствора. Если анализируемый образец твердый, то он должен быть перед растворением измельчен.

Растворение полимера чаще всего ведут в небольшом сушильном шкафу, температура которого на 5—10°С превышает температуру, при которой проводят анализ. Фильтрацию раствора проводят при температуре проведения анализа $\pm 0,5$ °С в специальных обогреваемых фильтрах с регулированием температуры обогрева. Фильтрат снова переносят в тот же сушильный шкаф и выдерживают там для нагревания и растворения осадка, который мог выпасть во время фильтрации. Раствор переносят в кран-дозатор шприцем с полым стеклянным поршнем, который заполнен очень мелкими алюминиевыми опилками и предварительно нагрет в том же сушильном шкафу. Данные операции при температуре более 60°С приходится проводить в шерстяных перчатках и по возможности быстро. Несмотря на все принятые меры предосторожности, наиболее высокомолекулярные фракции полимера могут выпасть из раствора. Однако их частицы столь малы, что не мешают заполнению петли. Чтобы они успели снова раствориться в термостатируемой петле крана-дозатора, пробу вводят в колонку через 5—10 мин после ее заполнения.

Описанная подготовка пробы достаточно длительна, а при высоких температурах возможны окисление и деструкция полимера. Приведенные здесь рекомендации носят поэтому общий характер; детали анализа конкретных полимеров уточняют в специальной литературе.

11.3. ВЫБОР ВАРИАНТА ВЭЖХ ДЛЯ АНАЛИЗА

Выбор варианта ВЭЖХ, который дает наиболее быструю и точную информацию об интересующем образце, является важным моментом работы. Как правило, хроматографист имеет данные о компонентах образца, такие как их химическое строение, молекулярная масса, растворимость, концентрация и др. Полнота этих данных в большей мере определяет, насколько удачно будет выбран вариант ВЭЖХ. Иногда есть

информация только об одном интересующем компоненте образца (например, лекарственном препарате, который нужно определить в плазме крови), иногда она вообще отсутствует (например, при изучении неизвестных образцов химикатов, пестицидов, стабилизаторов и др.).

Вопросы, на которые хроматографисту нужно знать ответы до выбора варианта ВЭЖХ, сводятся к следующим. Что будет интересовать — анализ следовых количеств или микропримесей, аналитическое разделение компонентов примерно равной концентрации, препаративное выделение разделенных компонентов для исследований или идентификации? Какова молекулярная масса образца или диапазон молекулярных масс компонентов? Какая полярность компонентов образца, их кислотность или, основность, способность диссоциировать на ионы? В каких растворителях растворимы компоненты образца и какова их растворимость? Нужно разделить близкие по молекулярной массе изомеры или ряд гомологов? Является ли вещество новым или используется давно? Есть ли опубликованные работы по ВЭЖХ этой смеси или близких по составу и свойствам смесей? Каковы характеристики образца по показателю преломления, УФ-спектру, флуоресценции и др.?

Не следует пренебрегать любой информацией об образце или его компонентах; особое значение имеет устойчивость образца к действию света, тепла, кислорода воздуха, влаги— как в виде раствора в элюенте, так и без растворителя. Иногда особые условия хранения (в темноте, на холоду, в атмосфере инертного газа) позволяют достаточно долго хранить нестабильные соединения. Чем менее стабильны исследуемые соединения, тем меньше времени должно проходить от момента приготовления образца в виде раствора до ввода его в хроматограф. Нередко удается путем введения в раствор образца стабилизаторов, регулирования pH, продувки инертным газом повысить устойчивость нестабильных соединений при хранении и получить точные и воспроизводимые результаты анализа.

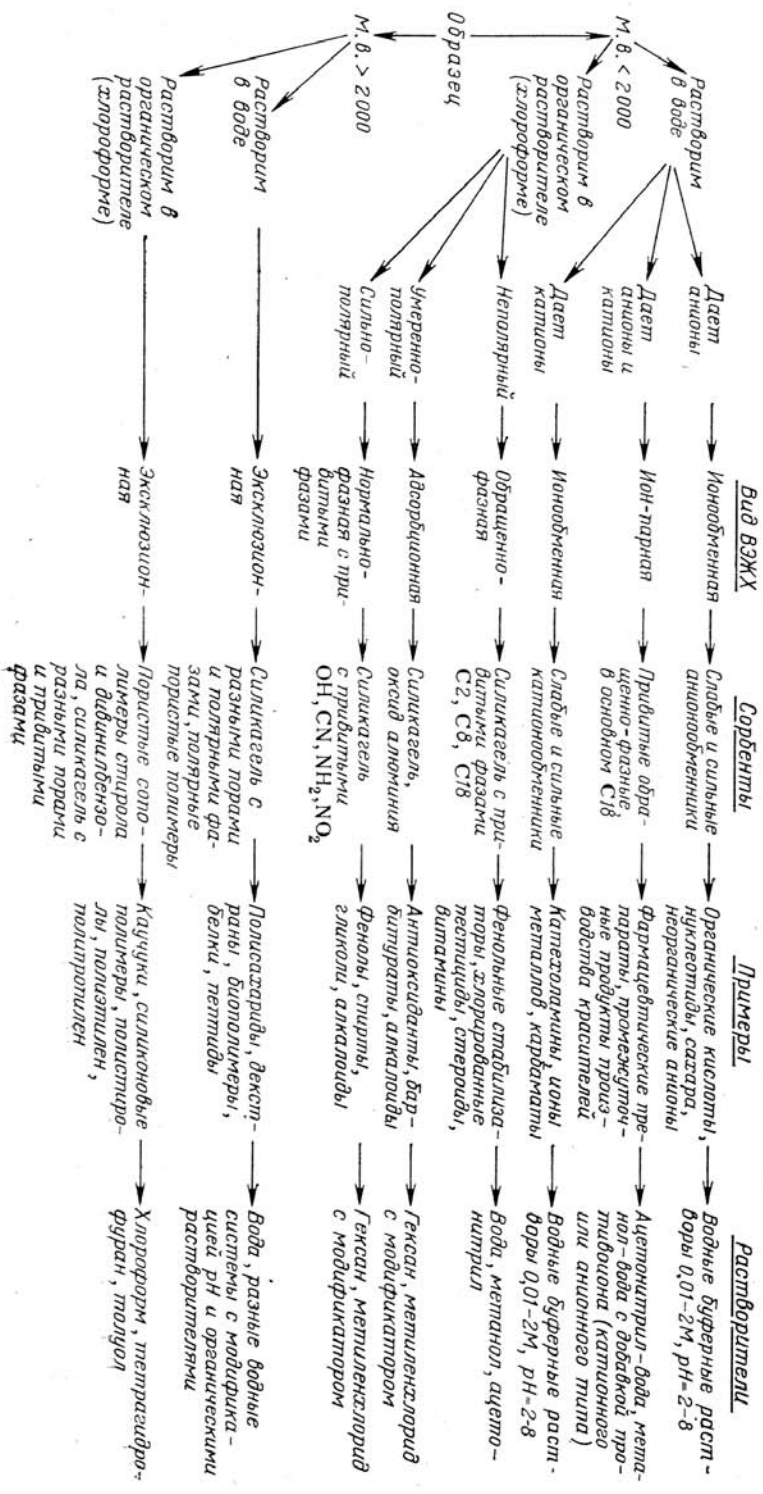
Особенно внимательно следует отнестись к изучению условий при подготовке образца, если есть опубликованные работы по анализу идентичных или близких соединений. Нередко целесообразно связаться с автором работы, обсудить с ним детали анализа, неясные из опубликованной работы, может быть, даже опробовать свои образцы в лаборатории автора на его хроматографе. Это зачастую позволяет избежать многих ошибок при воспроизведении методики.

Когда опыт хроматографиста по работе с какими-то веществами невелик, а опубликованных данных по их анализу найти не удалось, можно воспользоваться схемой выбора колонки с сорбентом того или иного типа. Ориентиром служат свойства образца, о которых имеются сведения или которые определяются экспериментально.

Очень полезным является использование тонкослойной хроматографии на сорбентах разных типов и с разными системами растворителей, особенно когда новых или неизвестных образцов несколько. Их можно наносить одновременно на пластинки с разными сорбентами и системами растворителей и получить большой объем информации по примерному подбору условий разделения за короткий отрезок времени. Большим преимуществом ТСХ для этой работы является то, что при проявлении пластин можно видеть положение пятен всех компонентов образца, в том числе и оставшихся на старте, и таким образом иметь полную картину разделения. Это зачастую позволяет избежать грубых ошибок при ВЭЖХ, так как не элюирующиеся компоненты не покидают начала колонки или движутся слишком медленно и могут быть потеряны (не достигают детектора, поэтому не детектируются и отсутствуют на полученной хроматограмме).

Если на первоначальных стадиях разработки методики использование ТСХ невозможно, рекомендуется использовать варианты метода ВЭЖХ с наибольшим диапазоном разделения и детектирования, например с градиентом растворителя и эксклюзионную хроматографию, детектирование в ближней УФ-области (около 200 нм) или по показателю преломления. Особенно полезна высокоэффективная эксклюзионная хроматография с рефрактометрическим детектором, позволяющая быстро исследовать большое количество образцов и установить наличие в них веществ любой молекулярной

Схема выбора варианта ВЭЖХ для анализа



массы, в том числе и тех, которые не поглощают в УФ-области (насыщенные алифатические углеводороды, олефины, спирты, эфиры и др.).

ГЛАВА 12

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО РЕМОНТУ, НАЛАДКЕ И ОБСЛУЖИВАНИЮ АППАРАТУРЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Аппаратура для ВЭЖХ работает при высоких давлениях и температурах в коррозионных средах. Поэтому, хотя для изготовления используют специально подобранные высокопрочные и коррозионно-стойкие материалы, периодически аппаратура должна подвергаться наладке и ремонту.

Прежде всего отметим несколько общих требований. Для ремонта оборудования должен быть назначен специалист высокой квалификации по ремонту точных механических, оптических и электронных приборов. При ремонте необходимо использовать инструменты высокого качества, которыми должны быть укомплектованы приборы при их закупке. Ремонту и разборке должен подвергаться только тот блок или узел хроматографа, который вышел из строя; разборка должна быть минимальной. Ремонт, разборку и сборку следует проводить на достаточно большом по площади, чистом и хорошо освещенном рабочем месте. Все инструкции, схемы и чертежи, которые были поставлены с оборудованием, должны тщательно и аккуратно храниться и использоваться при ремонте. Для каждого хроматографа или крупного узла необходимо вести журнал ремонта, в котором фиксируют ремонтные работы, выполненные при этом замены в электронных схемах, деталях, замечания по состоянию частей и т.д.

В отличие от отечественных хроматографов, которые поставляются, как правило, с комплектом запасных частей, инструментов, колонок и принадлежностей, импортные приборы обычно не включают или включают минимум запчастей принадлежностей и инструментов. Поэтому обычной ошибкой является закупка дорогостоящего импортного хроматографа без запасных частей, принадлежностей и инструментов для ремонта, на что требуются дополнительные средства в объеме 15—20% стоимости прибора. Какие запасные части, инструменты и принадлежности нужны для работы прибора в течение 3—5 лет, должен решать квалифицированный специалист при консультации с сервисным специалистом фирмы-поставщика. Часто выход из строя уплотнения поршня насоса или инжектора останавливает на длительный срок прибор стоимостью 15—50 тысяч рублей, хотя цена такой детали не превышает 10—30 рублей. Точно так же использование метрических ключей вместо дюймовых приводит к порче пазов в головках винтов и к невозможности разборки узла без серьезного ремонта.

Прежде чем приступить к рекомендациям по ремонту отдельных узлов приборов для ВЭЖХ, приведем несколько общих, важных для работающего на хроматографе указаний.

Надежная и стабильная работа жидкостного хроматографа в большой степени зависит от качества приготовления и свойств растворителей. Никогда не следует жалеть времени и средств на подготовку растворителей. Необходимо каждый растворитель после приготовления смеси нужного состава оставить на 1—2 ч, так как при этом из-за изменения при смешении растворимости могут выпасть осадки, затем профильтровать его через фильтр с порами 0,2—1 мкм под вакуумом в чистую колбу Бунзена. Профильтрованный растворитель следует перелить в тщательно вымытую и высушенную посуду и герметично закрыть.

Материал фильтра не должен растворяться в данном растворителе; наилучшие результаты дает использование нейлоновых или фторопластовых фильтров. Хранить приготовленный растворитель следует минимальное время в холодном темном месте; перед хранением необходимо продуть пространство над растворителем аргоном или другим инертным газом. Перед использованием растворитель, особенно стоявший

длительное время, необходимо слегка встряхнуть и осмотреть: наличие взвесей показывает, что необходимо растворитель заменить или по крайней мере профильтровать заново. Особое внимание следует обратить на воду, фосфатные и другие буферные растворы, в которых могут быстро расти микроорганизмы, колонии бактерий, водоросли.

Очень осторожно следует подходить к использованию хлорорганических растворителей, таких, как тетрахлорид углерода, хлороформ, метилхлорид, особенно в сочетании с кислыми, спиртовыми или другими содержащими следы воды растворителями. Такую же опасность для аппаратуры представляют и использование хлороводородной кислоты и ее солей. Ионы хлора вызывают активную коррозию нержавеющей стали с образованием глубоких проникающих трещин и отверстий. Поэтому работу с такими средами нужно по возможности исключить, а в случае необходимости проводить ее быстро, после чего сразу промывать систему инертными растворителями.

Следует тщательно очищать раствор пробы, фильтруя его или отделяя взвеси центрифугированием.

Перед работой с новым хроматографом, инжектором, детектором, самописцем следует предварительно тщательно изучить по инструкции его устройство, особенности работы и обслуживания. Несоблюдение требований инструкции, как правило, приводит к наиболее тяжелым последствиям — к длительному и сложному ремонту.

Никогда не стремитесь к длительной работе на приборе в предельных для него условиях. Это может привести к выходу прибора из строя или к резкому сокращению срока его службы.

Перейдем теперь к типичным неисправностям, способам их обнаружения и устранения.

1. Отсутствуют подача или давление растворителя.

1а. Течь в системе—найдите ее место и подтяните уплотнение до устранения течи.

1б. Инжектор находится в неправильном положении — поверните его в одно из крайних положений.

1в. В насос попал воздух—отсоедините от системы выход из насоса, допустите входной фильтр в растворитель полностью, засосите шприцем растворитель в насос, подсоединив его к выходу. Прокачивайте при максимальной подаче насоса до тех пор, пока не перестанут идти пузырьки воздуха из насоса. Подсоедините насос к системе.

1г. Испорчен указатель давления — проверьте, есть ли подача растворителя на выходе. Проверьте давление другим манометром, замените указатель давления.

1д. Кончился растворитель или фильтр находится выше уровня растворителя — налейте растворитель, опустите фильтр в растворитель.

1е. Насосная система не качает растворитель — проверьте, включен ли насос в сеть, есть ли напряжение, цел ли предохранитель. Проверьте положение ограничителей верхнего и нижнего давления.

1ж. Насос подает растворитель неравномерно — проверьте, не вскипает ли слишком легкокипящий растворитель при всасывании, замените его растворителем с более высокой температурой кипения.

1з. Засорен входной фильтр насоса — замените новым или промойте старый азотной кислотой, отсоединив от системы.

2. Насос создает давление, но потока растворителя нет.

2а. Засорены частицами инжектор, капилляры или верхний фильтр колонки — профильтруйте растворитель, образец. Последовательно двигаясь от насоса к колонке, найдите место засорения, устраните его. Замените фильтр колонки.

2б. Течь в системе — найдите место течи и подтяните уплотнение до устранения течи. Проверьте, не течет ли кювета детектора.

2в. Засорены линии в детекторе — немедленно выключите насос, тщательно очистите капилляры и кювету детектора, устраните засорение.

2г. Инжектор в неправильном среднем положении — переведите его в одно из крайних положений.

2д. Засорена частицами или загрязнениями колонка или ее верхний фильтр — замените верхний фильтр, замените колонку.

3. Шумы на нулевой линии детектора.

3а. Через кювету детектора проскакивают пузырьки воздуха — дегазируйте растворитель, прокачиванием удалите воздух из клапанов и поршневой камеры насоса. Проверьте все фитинги, через которые воздух может подсасываться в поток растворителя; обратите внимание на налеты соли и ржавчины около фитингов—затяжкой устраните негерметичность.

3б. Сорбент попадает из колонки в детектор с протоком растворителя— проверьте, правильно ли установлен выходной фильтр колонки, устраните неисправность, заменив на другой или подтяните фитинг.

3в. Течь в линиях или в приборе — найдите место течи и устраните.

3г. Большие пульсации давления при работе насоса — уменьшите их, встроив в систему демпфер пульсации или дополнительное гидравлическое сопротивление.

3д. Демпфер, гидравлическое сопротивление или манометр плохо промыты при смене растворителя — отсоедините от системы, тщательно удалите старый растворитель, промойте новым растворителем.

3е. Пузырьки воздуха в кювете детектора — удалите промывкой дегазированной растворителем, установите систему для создания на выходе из детектора противодавления.

3ж. Загрязнение кюветы детектора — отсоедините детектор от системы, промойте рядом смешиваемых сильных растворителей разного типа (например, хлороформ—тетрагидрофуран—метанол—вода). Промойте 50%-ной азотной кислотой, водой и растворителями. В сложных случаях разберите кювету, очистите ее и окошки.

3з. Шумит старая лампа детектора — проверьте и замените новой.

3и. Резкие колебания температуры влияют на работу детектора — установите теплообменник малого объема на входной линии детектора, устраните действие на детектор сквозняков и прямого солнечного света.

3к. Неправильно заземлен самописец — проверьте правильность и надежность заземления.

3л. Шумы от электронных компонентов — проверьте соответствующие платы детектора и самописца, заменяя их в соответствии с инструкцией. Проверьте, нет ли ненадежных или загрязненных контактов — промойте, зачистите контакты. Проверьте, нет ли вибрации. Если шумы наблюдаются при работе на высокой чувствительности детектора — проверьте, не устарела ли лампа-источник, замените ее новой.

4. Дрейф нулевой линии.

4а. Загрязнение рабочей или сравнительной кюветы детектора — промойте кюветы растворителями или осторожно очистите кюветы.

4б. Перепады температуры между узлами хроматографа—проверьте, нет ли на месте установки прибора сквозняков, действия прямых солнечных лучей, поставьте тепловую изоляцию колонки и подводящего и отводящего растворитель капилляров или используйте рубашку для колонки с циркуляцией воды от термостата.

4в. Загрязняющие частицы в системе—проверьте, нет ли частиц от резиновой мембраны инжектора, смените мембрану. Проверьте, не загрязнена ли колонка —промойте ее от оставшихся загрязнений, введенных с образцами. Проверьте, нет ли отщепления привитой фазы от сорбента под действием растворителя, замените колонку или подвижную фазу, введите «насыщающую» колонку до инжектора (особенно если работаете при повышенных температурах) для предотвращения растворения или деструкции сорбента рабочей колонки.

4г. Течь в системе—найдите ее и устраните.

- 4д. Пузырьки, образовавшиеся в кювете — промойте кювету, дегазируйте растворитель, найдите и устраните все течи в системе, установите систему для создания давления на выходе из кюветы.
- 4е. Несмешивающийся растворитель или зоны, содержащие растворитель, несмешивающийся с используемым (предыдущий растворитель не полностью удален из системы) — промойте систему несколькими полностью смешивающимися растворителями, пока в ней останется только нужный для работы растворитель.
- 4ж. Подвижная фаза не пришла в равновесие с колонкой — продолжайте промывать систему до достижения равновесия.
- 4з. Вскипание подвижной фазы или пробы—проверьте температуры кипения растворителя и компонентов пробы.
- 4и. Грязный растворитель—замените чистым.
- 4к. Плохой источник излучения в детекторе—замените новым.
- 4л. Неисправность в самописце — закоротите выход детектора, если дрейф нулевой линии продолжается — проверьте самописец.
5. Нулевая линия в виде ступенек, пики со срезанными верхушками, нулевая линия не возвращается к нулю.
- 5а. Усиление и демпфирование самописца неправильно отрегулированы — отрегулируйте.
- 5б. Плохое заземление—проверьте, не оборвано ли заземление, проверьте надежность контакта и заземления.
- 5в. Слишком сильный сигнал—уменьшите размер пробы.
6. Всплески на нулевой линии.
- 6в. Пузырьки воздуха проскакивают через детектор — дегазируйте растворитель, найдите и устраните все негерметичности, вымойте сильным потоком растворителя воздух из насоса и клапанов. Проверьте температуру кипения растворителя.
- 6б. Неправильное заземление—заземлите правильно.
- 6в. На электронные блоки влияют наводки по сети от включения и выключения другого лабораторного оборудования (например, термостатов) — проверьте, какое оборудование подключено к этой же линии тока и дает наводки, отключите его.
- 6г. Плохое соединение (контакт) в электронных узлах — проверьте все соединения и контакты, убедитесь в отсутствие вибрации, проверьте надежность крепления лампы — источника света.
7. Отрицательные пики.
- 7а. Неправильная полярность детектора или самописца — переключите полярность.
- 7б. Отрицательные пики на нулевой линии при УФ-детекторе — в образце или растворителе образца присутствуют примеси, поглощающие УФ-излучение меньше, чем основной растворитель. Неудачно выбран растворитель пробы.
- 7е. Отрицательные пики при нулевом объеме — результат перепадов давления и изменения показателя преломления при вводе образца. При количественных расчетах не принимайте во внимание пики около нулевого объема (ложные пики).
8. Неправильная форма пиков.
- 8а. Пики со срезанными верхушками. Если пузыри в детекторе — дегазируйте растворитель, установите систему для создания давления на выходе из кюветы. Накопились загрязнения на окнах ячейки кюветы—очистите кювету детектора. Нарушена регулировка оптической системы—отрегулируйте и установите правильно. Прохождение света через сравнительную кювету меньше, чем через рабочую — очистите кювету.
- 8б. Уширенные пики — работаете вне линейного динамического диапазона детектора, уменьшите размер пробы. Слишком низкое усиление самописца — отрегулируйте усиление.
- 8в. Образец не вымывается из колонки — смените колонку на другую, более соответствующую химическим свойствам пробы (устраните хемосорбцию, адсорбцию). Увеличьте температуру колонки. Измените ионную силу или pH растворителя.
- 8г. Колонка высохла на концах — замените колонку.

- 8д. Колонка перегружена образцом — уменьшите пробу.
- 8е. Загрязнены окошки кюветы — очистите кювету.
9. Пики не разделяются.
- 9а. Колонка перегружена пробой—уменьшите размер пробы.
- 9б. Колонка потеряла эффективность — регенерируйте колонку или замените ее новой.
- 9в. От сорбента отщепилась привитая фаза — замените колонку новой.
- 9г. Грязная колонка — промойте подходящими растворителями или замените.
- 9д. Нарушена структура слоя сорбента (потрескался, сжался) — замените колонку.
- 9е. Поставлена не та колонка или взята не та подвижная фаза — замените соответствующими.
10. Увеличен удерживаемый объем.
- 10а. Уменьшилась скорость потока растворителя — проверьте расход и увеличьте скорость потока. Если она уменьшается — проверьте герметичность и устраните течи в системе.
- 10б. Снизилась температура колонки — установите рубашку, отрегулируйте температуру.
- 10в. Изменилась активность колонки, растворитель удалил с сорбента воду или нанесенную фазу — восстановите активность, добавив воду или жидкую фазу к растворителю и пропустив его через сорбент.
11. Уменьшен удерживаемый объем.
- 11а. Увеличилась скорость подачи растворителя — отрегулируйте.
- 11б. Изменилась активность силикагелевой колонки (она набрала воду из неосушенного растворителя) — подавайте сухой растворитель до восстановления активности, удалите воду химически или замените колонку.
- 11в. Неправильно выбрана подвижная фаза — проверьте состав и компоненты фазы.
12. Самописец не выводится на нуль.
- 12а. Пузырьки в сравнительной кювете УФ-детектора — промойте и заполните рабочим растворителем без пузырьков или воздухом.
- 12б. Растворитель другого состава в сравнительной кювете рефрактометрического детектора — промойте и заполните рабочим растворителем.
- 12в. Подвижная фаза не пришла в равновесие с колонкой — промывайте до установления равновесия.
- 12г. Подвижная фаза не подходит для детектора — показатель преломления вне рабочего диапазона рефрактометра или УФ-поглощение слишком велико для УФ-детектора; замените растворитель.
- 12д. Фон создает колонка — проверьте, нет ли растворения матрицы, не подвергается ли привитая фаза отщеплению в выбранном растворителе — замените растворитель.
- 12е. Из колонки выходят загрязнения от проб или грязного растворителя — тщательно промойте колонку подходящим растворителем или системой смешивающихся растворителей либо замените колонку.
- 12ж. Ранее использовавшаяся подвижная фаза не удалена из системы — тщательно промойте систему.
- 12з. Детектор не подсоединен к самописцу или отсоединился от него — проверьте и подключите.
- 12и. Лампа — источник света в детекторе отработала ресурс или вышла из строя — замените лампу.
- 12к. Грязные окошки кюветы — очистите.
- 12л. Частицы в кювете детектора — промойте и очистите кювету.
- 12м. Отказал электронный блок детектора — отремонтируйте.
- 12н. Не включен или отключился от сети детектор или самописец—проверьте соответствующие вилки и тумблеры.
- 12о. Неправильно установлено положение нуля самописца — отрегулируйте.
- 12п. Ручка калибровки самописца в неправильном положении — установите правильно.
13. Низкая чувствительность.
- 13а. Неверная скорость потока — отрегулируйте.

- 13б. Образец и детектор не согласуются — отрегулируйте детектор, чтобы он соответствовал свойствам пробы, или замените его.
- 13в. Недостаточное количество образца — увеличьте пробу.
- 13г. Образец не вымывается из колонки (сорбируется) — проверьте химический состав пробы, смените растворитель или колонку.
- 13д. Грязные окошки кюветы детектора — очистите.
- 13е. Газовые пузырьки в кювете детектора — дегазируйте растворитель, создайте давление на выходе из кюветы.
- 13ж. Слишком грубая шкала чувствительности детектора — увеличьте чувствительность.
- 13з. Детектор или самописец не откалиброваны—откалибруйте.
- 13и. Выходит из строя лампа-источник света в детекторе — замените новой.
- 13к. Самописец установлен не на тот диапазон измерения, на которые рассчитан детектор — проверьте по паспорту детектора и установите нужный диапазон.
14. Нет пиков, нет отклика.
- 14а. Детектор или самописец не включены или не подсоединены к сети — включите, проверьте соединение.
- 14б. Не вводится проба — проверьте исправность шприца и инжектора, прочистите и промойте их, если неисправны — замените.
- 14в. Неисправность в электронных узлах — проверьте исправность предохранителей, устраните неисправность согласно инструкции по ремонту блоков хроматографа.

1. ОСНОВНЫЕ ПОСТАВЩИКИ АППАРАТУРЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Комплектные хроматографы и отдельные узлы для ВЭЖХ выпускает более 100 фирм. В таблице перечислены наиболее известные фирмы, выпускающие хорошо зарекомендовавшее себя оборудование.

Кроме фирм-производителей, перечисленных в таблице, существует значительное количество более мелких или менее популярных фирм, выпускающих интересные по характеристикам или возможностям компоненты, узлы или детали для ВЭЖХ. Есть фирмы, комплектующие свою программу из оборудования разных фирм-производителей (как правило, небольших и узко специализированных) и имеющие широкий ассортимент компонентов и узлов для ВЭЖХ.

Фирма Вэлко производит петлевые инжекторы высокого давления, а также широкий ассортимент недорогих фитингов специально для ВЭЖХ. Фирма Реодайн специализируется в производстве петлевых инжекторов высокого давления разных назначений. Большая часть крупных фирм-производителей оборудования и хроматографов для ВЭЖХ используют инжекторы одной из этих двух фирм. В последнее время начала производство насосов, инжекторов наряду с широким ассортиментом специальных фитингов для ВЭЖХ, фильтров, кранов высокого давления, демпферов, колонок предколо-нок оригинальной конструкции фирма Саентифик Системз, Инк (ССИ).

Широкий ассортимент практически всех компонентов для ВЭЖХ, исключая комплектные хроматографы, производит ряд фирм-комплектующих, часто имеющих также и свою небольшую программу производства. К таким фирмам относятся прежде всего Оллтек Ассоушиэйтс, Инк (в последнее время объединилась с Эпплайд Сайенс), Рейнин Инструменте, Супелко, Ана-чабс Хромпак ЭйчПиЭлСи Текнолоджи. Особенно следует отметить широкую программу оборудования и колонок разных типов, которые у этих фирм обычно стоят значительно дешевле (при том же качестве), чем у фирм-производителей.

Часто когда возникает необходимость докомплектации имеющегося оборудования или приобретения нового взамен устаревшего или вышедшего из строя нужно выбрать оборудование из довольно широкого ассортимента, предлагаемого разными фирмами. Так как обновление оборудования для ВЭЖХ происходит очень интенсивно и быстро, очень трудно дать рекомендации что является наилучшим в последнее время — это

лучше всего может посоветовать специалист, давно работающий по ВЭЖХ и внимательно следящий за развитием приборостроения. Тем не менее можно сообщить полезную ориентировочную информацию о блоках и узлах разных фирм, которые пользуются хорошей репутацией у хроматографистов.

Бекман (Алтекс) — насосы, заполненные колонки с Ультрасферами и Сферогелями.

Дюпон — сорбенты Зорбакс и заполненные колонки, в том числе для эксклюзионной ВЭЖХ.

Жилсон — насосы от микроколоночного до препаративного, коллекторы фракций, программатор градиента.

Хьюлет — Пакард — процессоры, интеграторы.

Джаско — трехплунжерные и двухплунжерные насосы, микроколоночный хроматограф, УФ-спектрофотометрический и флюориметрический детекторы, микроколоночки, проточный дегазатор, ИК-детектор.

ЛДЦ — детекторы, управляющая ЭВМ, насосы, интегратор.

ЛКБ — биологические применения, УФ-детектор.

Фармация — колонки для анализа белков.

Шимадзу — микропроцессоры и интеграторы, насосы и спектрофотометрические детекторы для микроколоночной ВЭЖХ, микроколоночки.

Спектра — Физикс — микропроцессоры и интеграторы.

Уотерс — применение в разных областях ВЭЖХ, эксклюзионная хроматография полимеров и биополимеров, заполненные колонки, препаративная хроматография большого масштаба, узкоспециализированные автоматизированные системы для ВЭЖХ.

Кнауэр — детекторы, в том числе высокотемпературный рефрактометр для ГПХ, инжекторы.

Иско — коллекторы фракций, спектрофотометрический детектор, микроколоночный хроматограф.

Текатор — высокочувствительный рефрактометр, хроматограф для Сахаров и липидов.

Эрма Оптикэл Уокз — высокочувствительный рефрактометр, проточные дегазаторы.

Уилкс — ИК- детектор.

Биотроник — ионный хроматограф.

Тойо-Сода — колонки заполненные для ГПХ, в том числе для биополимеров.

Реодайн — инжекторы.

Валко — инжекторы, фитинги для ВЭЖХ.

Паркер-Ханнифин — фитинги для ВЭЖХ.

Кроуфорд Фитинг Кампани — фитинги для ВЭЖХ «Сважелок».

ССИ — насосы, фильтры низкого и высокого давления, микрообъемные вентили высокого давления, фитинги для ВЭЖХ, демпферы.

Ватман — сорбенты «Партисил», заполненные колонки для биомедицинских применений.

Мерк — сорбенты «Лихросорб» и «Лихросфер», колонки.

Мэчери — Нэгель — сорбенты «Полигосил» и «Нуклеосил», колонки.

Фэйз Сопарэйшн — сорбенты «Сферисорб».

Сепарэйшнс Труп — сорбенты «Видак».

Шэндон Саутерн — сорбенты «Хайперсил», система набивки колонок, заполненные колонки.

Хемко — система набивки колонок.

Хаскел Инжиниринг — система набивки колонок, насосы гидropневматического усиления.

Полимер Лабораториз — колонки для ГПХ полимеров.

БАС — электрохимический детектор и его биомедицинские применения.

Гамильтон — микрошприцы, шприцы, краны низкого давления, иглы.

Сайентифик Гласе Инжиниринг — микрошприцы, остеклованные внутри нержавеющей трубки, колонки.

Элдекс — недорогие насосы для аналитической и препаративной работы, программатор, демпфер — ограничитель давления.

Кратос — детекторы для ВЭЖХ — спектрофотометрические и флюориметрические, насосы.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Цвем М. С.* // Труды Варшавского общества естествоиспытателей, отд. биологии, 1903, т. 14, с. 20—32.
2. *Snyder L. K. Kirkland J. J.* Introduction to Modern Liquid Chromatography. 2-nd edition. J. Wiley, N. Y., 1979. 863 p.
3. *Parris N. A.* Instrumental Liquid Chromatography. 2-nd ed. Elsevier, Oxford, 1984. 270 p.
4. *Bristow P. A.* LC in Practice, hetp, Handforth, 1976. 267 p.
5. *Киселев А. В., Яшин Я. И.* Адсорбционная газовая и жидкостная хроматография. М., Химия, 1979. 288 с.
6. *Энгельгардт Х.* Жидкостная хроматография при высоких давлениях: Пер. с англ. М., Мир, 1980. 245 с.
7. Жидкостная колоночная хроматография/Под ред. З. Дейла, К. Мащека, Я. Янака. Пер. с англ. (в 3-х томах). М., Мир, 1978.
8. *Остерман Л. А.* Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М., Наука, 1985. 536 с.
9. *Berendsen G. E., DeGalan R./I.* Chromatogr., 1980, v. 196, No. 1, p. 21—37.
10. *Cooke N. H. C., Olsen I./I.* J. Chromatogr. Sci., 1980, v. 18, p. 1—12.
11. *Scottt C. D., Lee N. E./I.* J. Chromatogr., 1973, v. 83, p. 383—393.
12. *Kabra P. M., Marion L. J.* Liquid Chromatography in Clinical Analysis. Humana Press, Clifftond, 1981. 466 p.
13. *Edelson E. H., e. a./I.* J. Chromatogr., 1979, v. 174, p. 409—419.
14. *Krstulovic A. M., Brown P. R.* Reversed-Phase Liquid Chromatography; Theory, Practice and Biomedical Applications. J. Wiley. N. Y., 1982. 296 p.
15. *Hamaji M., Seki G./I.* J. Chromatogr., Biomed. Appl., 1979, v. 163, p. 329—336.
16. *Фритц Дж., Гьерзе Д. Г., Поланд К.* Ионная хроматография: Пер. с англ./Под ред. В. Г. Березкина. М., Мир, 1984. 224 с.
17. *Шпигун О. А., Золотое Ю. Л.* /Зав. лаб., 1982, т. 48, № 9, с. 4.
18. *Small Я./Anal. Chem.*, 1983, v. 55, p. 235A.
19. *Беленький Б. Г., Виленчик Л. З.* Хроматография полимеров. М., Химия, 1978. 344 с.
20. *Van W., Kirkland J., Bly D.* Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography. N. Y., J. Wiley, 1979. 476 p.
21. *Нефедов П. П., Лавренко П. Н.* Транспортные методы в аналитической химии полимеров. Л., Химия, 1979. 232 с.
22. *Тенников М. Б. и др.* /Высокомолекулярные соединения, 1977, т. А19, № 3, с. 657—660.
23. *Mori S., Suzuki T./Anal. Chem.*, 1980, v. 52, No. 11, p. 1625—1629.
24. *Aleksandrov M. L. e. a./I.* High Resol. Chromatogr. Commun, 1983, v. 6, No. 11, p. 629—631.
25. *Yau W., Grinnard G., Kirkland I./I.* J. Chromatogr., 1978, v. 149, p. 465.
26. *Виленчик Л. З. и др.* /Высокомолекулярные соединения, 1980, т. А22, № 11, с. 2801—2804.
27. *Нестеров В. В. и др.* /Высокомолекулярные соединения, 1984, т. Б26, № 3, с. 163—167.
28. *Benson J. R., Woo D. /I.* J. Chromatogr. Sci, 1984, v. 22, No. 9, p. 386—399.
29. *Zdanov S. P. e. a./I.* J. Chromatogr, 1973, v. 77, No. 2, p. 149—159.
30. *Schlechter /I.* Anal. Biochem, 1974, v. 58, No. 1, p. 30.
31. *Нефедов П. П. и др.* /Высокомолекулярные соединения, 1981, т. А23, № 5, с. 943—950.
32. *Nakamura K., Endo R./I.* Appl. Polym. Sci, 1981, v. 26, p. 2657—2664.
33. *Ициксон Л. Б., Филиппов А. А.* // В кн.: III Всесоюзный симпозиум по молекулярной жидкостной хроматографии, тезисы докладов. Рига, изд. Института органич. синтеза АН Латв.ССР, 1984, с. 126—127.
34. *Barth H. G./I.* J. Chromatogr. Sci, 1980, v. 18, No. 9, p. 409—429.
35. *Беленький Б. Г., Мальцев В. Г.* // В кн.: Прикладная хроматография. М., Наука, 1984, с. 54—64.
36. *Энтелис С. Г., Евреинов В. В., Кузаев А. И.* Реакционноспособные олигомеры. М, Химия, 1985.
37. *Janca J., Kleparnik K./I.* J. Liquid Chromatogr., 1982, v. 5, No. 2, p. 193—216.
38. *Chamberlin T. A., Tulnstra H. E./Anal. Chem.*, 1983, v. 55, No. 3, p. 428—432.
39. *Shulz W. W./I.* J. Liquid Chromatogr., 1980, v. 3, No. 7, p. 941—952.
40. *Neff B. L., Overton J. R./I.* J. Liquid Chromatogr., 1984, v. 7, No. 8, p. 1537—1544.
41. *Mori S., Suzuki M./I.* J. Liquid Chromatogr., 1984, v. 7, No. 9, p. 1841—1850.
42. *Нефедов П. П.* Канд. дис. Л., ИВС АН СССР, 1973. 150 с.
43. *Виленчик Л. З., Курбенин О. И., Беленький Б. Л.* /Высокомолекулярные соединения, 1984, т. А26, № 10, с. 2223—2226.
44. *Grubisic Z., Rempp R., Venoit Я./I.* J. Polym. Sci., 1967, v. B5, No. 9, p. 753.
45. *Рафиков С. Р., Будтов В. П., Монаков Ю. Б.* Введение в физико-химию растворов полимеров. М., Наука, 1978. 328 с.
46. *Samay G /Ada chim. Acad. sci. Hung.*, 1979, v. 102, No. 2, p. 157—164.

47. Dawkins J. F./Steric Exclusion Liquid Chromatography of Polymers. *Chromatogr. Sci.*, 1984, v. 25, p. 53—116.
48. Kubin M./J. Liquid Chromatogr., 1984, v. 7, No. 1, p. 41—68.
49. Baker D. R., George S. A./Amer. Lab., 1980, v. 12, No. 1, p. 41—46.
50. Bly D. D./Anal Chem, 1969, v. 41, No. 2, p. 477—480.
51. Drott E. E./in *Chromatographic Science Series*, v. 8, *Liquid Chromatography of Polymers and Related Materials*, ed. J. Gazes. N. Y., M. Dekker, 1977, p. 41.
52. Krishen A., Tucker R. G./Anal. Chem., 1977, v. 49, No. 4, p. 898.
53. Mori S., Yamakawa A./J. Liquid Chromatogr., 1980, v. 3, No. 3, p. 329—342.
54. Verzele M., Geeraert E./J. Chromatogr. Sci, 1980, v. 18, No. 10, p. 559—570.
55. Nettleton D. E./J. Liquid Chromatogr, 1981, suppl. No. 2, p. 359—398.
56. Rable F. M./International Lab, 1980, v. 10, No. 8, p. 91—98.
57. *Small Bore Liquid Chromatography Columns*/ed. R. P. W. Scott. N. Y., J. Wiley, 1984. 294 p.
58. *Microcolumn High-Performance Liquid Chromatography*/ed. P. Kucera. N. Y, Elsevier, 1984. 302 p.
59. Scott R. P. W., Kucera P./J. Chromatogr, 1979, v. 169, p. 51—62.
60. Scott R. P. W., Kucera P./J. Chromatogr, 1979, v. 185, p. 22—31.
61. Scott R. P. W./J. Chromatogr. Sci, 1980, v. 18, No. 1, p. 49—54.
62. Reese R. E., Scott R. P. W./J. Chromatogr. Sci, 1980, v. 18, No. 8, p. 479—486.
63. Scott R. P. W., Simpson C. F./J. Chromatogr. Sci, 1981, v. 19, No. 5, 224—233.
64. Kucera P./J. Chromatogr, 1980, v. 198, p. 93—109.
65. Bowermaster J., McNair Я./J. Chromatogr, 1983, v. 279, p. 431—438.
66. Scott R. P. F./Adv. Chromatogr., 1983, v. 22, p. 247—294.
67. Van der Berg J. H. M., Horsels H. W. M., Groenen R. J. Af./Chromatographia, 1984, v. 18, No. 10, p. 574—578.
68. Freebairn K. W., Knox J. Я./Chromatographia, 1984, v. 19, No. 1, p. 37—47.
69. Schoenmakers P. I., Billiet H. A. H., DeGalan L./J. Chromatogr, 1981, v. 205, p. 13—30.
70. Jandera P., Churacek J./J. Chromatogr, 1980, v. 192, No. 1, p. 19—36.
71. Lawrence J. F., Frel R. W. *Chemical Derivatization in Liquid Chromatography*. Amsterdam, Elsevier, 1976. 277 p.
72. Morris C. I., Morris P. *Separation Methods in Biochemistry*. N. Y, J. Wiley, 1976. 267 p.
73. Blau K., King G. S. *Handbook of Derivatives for Chromatography* London, Heyden, 1977. 784 p.
74. Kissinger P. T. e. a./J. Chromatogr. Sci, 1979, v. 17, p. 137.
75. Lawrence J. F. *Organic Trace Analysis by Liquid Chromatography*. N. Y., Acad. Press, 1981. 288 p.
76. Roos R. W./J. Chromatogr. Sci, 1976, v. 14, p. 505.
77. Nachtmann P., Budna K. W./J. Chromatogr, 1977, v. 136, p. 279.
78. Clark C. R., Wells M. M./J. Chromatogr. Sci, 1978, v. 16, p. 332.
79. Fitzpatrick F. A., Wanada M. A., Kaiser D. G./Anal. chem, 1977, v. 49, p. 1032.
80. Dunlap K. L., Sandridge R. L., Keller I./Anal. Chem, 1976, v. 48, p. 297.
81. Poole C. F, e. a./J. High Resol. Chromatogr. Commun., 1978, v. 1, p. 83.
82. Denkert M. e. a./J. Chromatogr, 1981, v. 218, p. 31—43.
83. Bartha A. e. a./J. Chromatogr, 1984, v. 303, p. 29—38.
84. Gloor R., Johnson E. L./J. Chromatogr. Sci, 1977, v. 15, p. 413—423.
85. Kraak J. C., Jonker K. M., Huber J. F. K./J. Chromatogr, 1977, v. 142, p. 671—680.
86. Wehli A. e. a./J. Chromatogr, 1979, v. 149, p. 199—210.
87. Даванков В. Л./Журн. ВХО им. Менделеева, 1983, т. XXVIII, № 1, с. 25—29.
88. Даванков В. А./в кн. *Прикладная хроматография*/Под ред. К. И. Сако-дынского. М, Наука, 1984, с. 24—32.
89. Davankov V. A., Kurganov A. A., Bochkov A. S./in *Advances in Chromatography*/ed. J. C. Giddings e. a. N. Y, M. Dekker, 1983, v. 22, p. 139—185.
90. Apffel J. A., Alfredson T. V., Major R. E./J. Chromatogr, 1981, v. 206, p. 43—57.
91. Ohmacht R., Halasz I./Chromatographia, 1981, v. 14, p. 155—161, p. 216—226.
92. Engelhardt H., Muller Я./J. Chromatogr, 1981, v. 218, p. 395—407.
93. Bredeveg R. A., Rothman L. D., Pfeiffer C. D./Anal Chem, 1979, v. 51, No. 12, p. 2061—2063.
94. Nice E. C., O'Hara M. J./J. Chromatogr, 1978, v. 166, p. 263—267.
95. Atwood J. G., Goldstain J./J. Chromatogr. Sci, 1980, v. 18, p. 650—654.)6. Pearson J. D., Lin N. T., Regnier F. E./Anal Biochemistry, 1982, v. 124, p. 217—230.
97. Rimer J., McKlintock R., Galyean R. e. a./J. Chromatogr, 1984, v. 288, p. 303—328.
98. Rimer L, McKlintock R./J. Chromatogr, 1983, v. 268, p. 112—119.
99. Wise S. A., Bonnett W. J. e. a./J. Chromatogr. Sci, 1981, v. 19, p. 457—465.
100. Verzele M., Dewaele C./Chromatographia, 1984, v. 18, No. 2, p. 84—86.
101. Chmlelowiec J., George A. E./Anal Chem, 1980, v. 52, No. 7, p. 1154—1157.
102. Nahum A., Norvath C./J. Chromatogr, 1981, v. 203, p. 53—63.
103. Matsusaki T. e. a./J. Liquid Chromatogr, 1980, v. 3, No. 3, p. 353—365.
104. Mori S./J. Chromatogr, 1980, v. 192, No. 2, p. 295—305.
105. Ishiguro S., Inoue Y., Hosogane T./J. Chromatogr, 1982, v. 239, No. 4, p. 651—659.
106. Dubin P. L., Levy I. J./J. Chromatogr, 1982, v. 235, No. 2, p. 377—
387. 107. Артемьева А. А. и др./Высокомолекуляр. соед., 1978, т. А20, № 12, 2735—2740.
108. Regnier P., Noel R./J. Chromatogr. Sci, 1976, v. 14, No. 8, p. 316—321.
109. Rokushika S., Ohkawa T., Hatano Я./J. Chromatogr, 1979, v. 176, No. 3, p. 456—461.
110. Kuwata Я, Uebori M., Yamazaki Y./J. Chromatogr, 1981, v. 211, p. 378—382.
111. Daldrup T., Kardel B./Chromatographia, 1984, v. 18, No. 2, p. 81—83.

112. Engelhardt H., Muller H., Dreuer B./Chromatographia, 1984, v. 19, p. 240—245.
113. Химический энциклопедический словарь./Под ред. И. Л. Кнунянца. М., Сов. Энциклопедия, 1983. 792 с.
114. Snyder L. R./J. Chromatogr. Sci., 1978, v. 16, p. 223.
115. Snyder L. B. Principles of Adsorption Chromatography. N. Y., M. Dekker, 1976.
116. Современное состояние жидкостной хроматографии./Под ред. Дж. Кирк-ланда. Пер. с англ. М., Мир, 1974, с. 167.
117. Snyder L. R./in High-Performance Liquid Chromatography, v. 3./Ed. C. Horvath. N. Y., Academic Press, 1983, p. 157—223.
118. Burfield D. R., Smithers R. Я./Chem. Ind., 1980, v. 15, No. 2, p. 240.
119. Wortel Th. M., Bekkum H./J. Org. Chem., 1980, v. 45, No. 23, p. 4763—4764.
120. Little C. J. e. a./J. Chromatogr., 1979, v. 169, No. 3, p. 381.
121. Walter M., Ramaley L./Anal. Chem., 1973, v. 45, No. 1, p. 165.
122. Berry V. V./J. Chromatogr., 1980, v. 199, p. 219—238.
123. Berry V. V./J. Chromatogr., 1982, v. 236, No. 2, p. 279—296.
124. Liquid Chromatography Detektors./Ed. T. M. Vickrey. N. Y., M. Dekker, 1983. 434 p.
125. Камышши Л. Г., Ициксон Л. Б., Филиппов А. А./В кн.: Синтез, модификация и физико-химические свойства лакокрасочных систем. Сб. трудов ГИПИ ЛКП. М., НИИТЭХИМ, 1983, с. 59—66.
126. Mowery R. A./J. Chromatogr. Sci., 1985, v. 23, No. 1, p. 22—29.
127. Scientific Systems, Inc. Liquid Chromatography Catalog, 1985, p. 22.

Производственное издание

ЕВГЕНИЙ ЛЬВОВИЧ СТЫСКИН ЛЕВ БОРИСОВИЧ ИЦИКСОН ЕВГЕНИЙ ВИКТОРОВИЧ БРАУДЕ

ПРАКТИЧЕСКАЯ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Редактор *В. Л. Абрамова*
Художник *Е. В. Бекетов*
Художественный редактор *К. К. Федоров*
Технический редактор *Н. Ю. Белякова*
Корректор *Н. А. Иванова*

ИБ № 1890

Сдано в наб. 11.04.86. Подп. в печ. 30.06.86. Т 14497. Формат бумаги БОХЭО'Лб. Бумага кн.-журн. Гари, литературная. Печать высокая. Усл. печ. л. 18. Усл. кр.-отт. 18. Уч.-изд. л. 20,71. Тираж 6700 экз. Заказ № 256. Цена 1 р. 40 к. Изд. № 2864.
Ордена «Знак Почета» издательство «Химия», 107076, Москва, Стромынка, 21, корп. 2.
Московская типография № 11 Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. 113105, Москва, Нагатинская ул., д. 1.

ПРИЛОЖЕНИЯ

1. СВОЙСТВА СОРБЕНТОВ ДЛЯ ВЭЖХ

1.1. Свойства адсорбентов и притягиваемых сорбентов для ВЭЖХ

№ пп	Наименование	Производитель*	Форма частиц**	Размер частиц, мкм	Диаметр пор, нм	Удельная поверхность, м ² /г	Примечания
Сорбенты для обращенно-фазной ВЭЖХ							
1	Лихросорб РР-18	Мерк 7	Н	5,7,10	10	300	22% С
2	Лихросорб РР-8	Мерк 7	Н	5,7,10	10	300	14% С
3	Лихросорб РР-2	Мерк 7	Н	5,10	6	500	
4	Партисил ОДС-1	Ватман 2	Н	10	5	400	5% С
5	Партисил ОДС-2	Ватман 2	Н	10	5	400	16% С
6	Партисил ОДС-3	Ватман 2	Н	10	5	400	10% С
7	Партисил С8	М-Н6	С	3,5,7,10	10	300	
8	Нуклеосил С18	М-Н6	С	5,7,10	10	300	
9	Нуклеосил С8	М-Н6	С	5,10	8	220	6% С
10	Сферисорб ОДС	Ф.С.14	С	5,10	8	220	12% С
11	Сферисорб ОДС-2	Ф.С.14	С	5,10	8	220	
12	Сферисорб С8	Ф.С.14	С	5,10	8	220	
13	Сферисорб С6	Ф.С.14	С	5,10	8	220	
14	Сферисорб С1	Ф.С.14	С	5,10	8	220	
15	Хайперсил ОДС	Ш.С.17	С	3,5,10	10	170	
16	Хайперсил С8	Ш.С.17	С	3,5,10	10	170	
17	Хайперсил С8 широкопористый	Ш.С.17	С	5,10	30	170	Для больших молекул
18	Хайперсил С4 широкопористый	Ш.С.17	С	5,10	30	170	Смесь коротких алкилсиланов
19	Хайперсил САС	Ш.С.17	С	3,5,10	10	170	
20	μ-Бондапак С18	Уотерс 13	Н	10	300	300	10% С
21	μ-Бондапак Фенил	Уотерс 13	Н	10	300	300	То же
22	Зорбакс ОДС	Дюпон 3	С	8	7	350	16% С
23	Зорбакс С8	Дюпон 3	С	8	7	350	22% С
24	Зорбакс ТМС	Дюпон 3	С	8	7	350	15% С
25	РСил С18ЛЛ	РСЛ 9	Н	5,10	6	550	16% С
26	РСил С18ЛЛ	РСЛ 9	Н	5,10	6	550	10% С
27	РСил С8	РСЛ 9	Н	5,10	6	550	9% С
28	РСил С3	РСЛ 9	Н	5,10	6	550	
29	РСил Фенил	РСЛ 9	Н	5,10	6	550	
30	РСил С18	РСЛ 9	С	3,5,8	8	400	18% С
31	РСил С8	РСЛ 9	С	3,5,8	8	400	
32	РСил С3	РСЛ 9	С	3,5,8	8	400	
33	РСил Фенил	РСЛ 9	С	3,5,8	8	400	
34	Адсорбосфер С18	Э.С.19	С	5,10	8	200	
35	Адсорбосфер С8	Э.С.19	С	5,10	8	200	
36	Адсорбосфер ТМС	Э.С.19	С	5,10	8	200	Триметилхлорсилан
37	Видак ТП201 С18	С.Г.10	С	10	30	100	9% С
38	Видак 218ТП	С.Г.10	С	10	30	100	Для белков, С18

Продолжение

№ пп	Наименование	Производитель*	Форма частиц**	Размер частиц, мкм	Диаметр пор, нм	Удельная поверхность, м ² /г	Примечания
73	Течсил Амин	Э.Т.Ф.15	Н	5,10	6	500	
74	Течсил NO ₂	Э.Т.Ф.15	Н	5,10	6	500	
75	Течсил Нитрил	Э.Т.Ф.15	Н	5,10	6	500	
76	ЛихроПреп Дюол	Мерк 7	Н	25-40, 40-63	10	300	Преп. аналог 50
77	ЛихроПреп CN	Мерк 7	Н	25-40, 40-63	10	300	Преп. аналог 51
78	РСил-Преп CN	РСЛ 9	Н	15-25, 25-40	6	550	Преп. аналог 67
Сорбенты для адсорбционной ВЭЖХ							
79	Лихросорб СИ-60	Мерк 7	Н	5,10,20	6	500	
80	Лихросорб СИ-100	Мерк 7	Н	5,10	10	300	
81	Лихросфер СИ-100	Мерк 7	С	5,10	10	250	
82	Лихросфер СИ-300	Мерк 7	С	5,10	30	80	
83	Партисил	Ватман 2	Н	5,10,20	5	400	
84	Нуклеосил СИ-60	М-Н 6	С	5,7,10	6	500	
85	Нуклеосил СИ-100	М-Н 6	С	3,5,7,10	10	300	
86	Сферисорб	Ф.С.14	С	3,5,8,10	8	220	
87	Хайперсил	Ш.С.17	С	3,5,10	10	170	
88	Хайперсил широкопористый	Ш.С.17	С	5,10	30	170	
89	μ-Порасил	Уотерс 13	Н	10	300	300	
90	Зорбакс Сил	Дюпон 3	С	8	7	350	
91	РСил	РСЛ 9	Н	5,10	6	550	
92	РСил	РСЛ 9	С	3,5,8	8	400	
93	Адсорбосфер	Э.С.19	С	5,10	8	200	
94	Видак ТП101	С.Г.10	С	10	30	100	
95	Течсил	Э.Т.Ф.15	Н	5,10	6	500	
96	ЛихроПреп СИ-60	Мерк 7	Н	15-25, 25-40, 40-63	6	500	Преп. аналог 79
97	РСил-Преп	РСЛ 9	Н	15-25, 25-40	6	550	Преп. аналог 91
98	ТечоПреп	Э.Т.Ф.15	Н	15-25, 25-40, 40-63, 63-100	6	500	Преп. аналог 95
99	Сферисорб Алюмина	Ф.С.14	С	5,10,20	13	90	Оксид алюминия
100	Течсил Алюмина	Э.Т.Ф.15	Н	5,10	13	90	Оксид алюминия
Сорбенты производства стран СЭВ для ВЭЖХ							
101	Силасорб 600	Лахема 5	Н	5,7,10, 15,20	7	600	Силикагель, ЧССР

Продолжение

№ пп	Наименование	Производитель*	Форма частиц**	Размер частиц, мкм	Диаметр пор, нм	Удельная поверхность, м ² /г	Примечания
39	Видак 214 ТП	С.Г.10	С	10	30	100	Для белков, С4
40	Видак Дифенил	С.Г.10	С	10	30	100	Для белков
41	Видак ХС201 С18	С.Г.10	Н	10	6	600	
42	Течсил С18	Э.Т.Ф.15	Н	5,10	6	500	11% С, недорогой
43	Течсил С8	Э.Т.Ф.15	Н	5,10	6	500	8% С, недорогой
44	ТечоПреп С 18	Э.Т.Ф.15	Н	25-40, 40-63	6	500	Преп. аналог 42
45	ТечоПреп С8	Э.Т.Ф.15	Н	25-40, 40-63	6	500	Преп. аналог 43
46	ЛихроПреп РР-8	Мерк 7	Н	25-40, 40-63	10	300	Преп. аналог 2
47	РСил-Преп С8	РСЛ 9	Н	15-25, 25-40	6	550	Преп. аналог 27
48	РСил-Преп С18	РСЛ 9	Н	15-25, 25-40	6	550	Преп. аналог 25
Сорбенты с привитой фазой для нормально-фазной ВЭЖХ							
49	Лихросорб NH ₂	Мерк 7	Н	10	10	300	
50	Лихросорб Дюол	Мерк 7	Н	10	10	300	
51	Лихросорб CN	Мерк 7	Н	5,10	10	300	
52	Партисил Пак	Ватман 2	Н	10	5	400	Смесь CN и NH ₂ -групп
53	Нуклеосил NH ₂	М-Н 6	С	5,10	10	300	
54	Нуклеосил NO ₂	М-Н 6	С	5,10	10	300	
55	Нуклеосил N(CH ₃) ₂	М-Н 6	С	5,10	10	300	
56	Нуклеосил CN	М-Н 6	С	5,10	10	300	
57	Сферисорб Амин	Ф.С.14	С	5,10	8	220	
58	Сферисорб Нитрил	Ф.С.14	С	5,10	8	220	
59	Хайперсил АПС	Ш.С.17	С	3,5,10	10	170	Аминогруппы Нитрил
60	Хайперсил ЦПС	Ш.С.17	С	3,5,10	10	170	
61	μ-Бондапак NH ₂	Уотерс 13	Н	10	300	300	
62	μ-Бондапак CN	Уотерс 13	Н	10	300	300	
63	Зорбакс NH ₂	Дюпон 3	С	8	7	350	
64	Зорбакс CN	Дюпон 3	С	8	7	350	
65	РСил NH ₂	РСЛ 9	Н	6,10	6	550	
66	РСил NO ₂	РСЛ 9	Н	5,10	6	550	
67	РСил CN	РСЛ 9	Н	5,10	6	550	
68	РСил NH ₂	РСЛ 9	С	3,5,8	8	400	
69	РСил CN	РСЛ 9	С	3,5,8	8	400	
70	Адсорбосфер NH ₂	Э.С.19	С	5,10	8	200	
71	Адсорбосфер CN	Э.С.19	С	5,10	8	200	
72	Видак ТП501 CN	С.Г.10	С	10	30	100	

Продолжение

№ пп	Наименование	Производитель*	Форма частиц**	Размер частиц, мкм	Диаметр пор, нм	Удельная поверхность, м ² /г	Примечания
102	Силасорб 300	Лахема 5	Н	5,7,10, 15,20	10	300	Силикагель, ЧССР
103	Силасорб С18	Лахема 5	Н	5,7,10, 15,20	10	300	ЧССР
104	Силасорб С8	Лахема 5	Н	5,7,10, 15,20	10	300	ЧССР
105	Силасорб С2	Лахема 5	Н	5,7,10, 15,20	7	600	ЧССР
106	Силасорб NH ₂	Лахема 5	Н	5,7,10	10	300	ЧССР
107	Силасорб CN	Лахема 5	Н	5,7,10	10	300	ЧССР
108	Силасорб Дюол	Лахема 5	Н	5,7,10	10	300	ЧССР
109	Силасорб	Лахема 5	Н	5,7,10	10	300	Оксид алюминия, ЧССР
110	Сепарон	Л.П.4	С	5,10	10	300	Силикагель, ЧССР
111	Сепарон С18	Л.П.4	С	5,10	10	300	ЧССР
112	Сепарон С8	Л.П.4	С	5,10	10	300	ЧССР
113	Сепарон NH ₂	Л.П.4	С	5,10	10	300	ЧССР
114	Сепарон CN	Л.П.4	С	5,10	10	300	ЧССР

* Номер см. в приложении 7.

** Н - неправильная, С - сферическая.

1.2. Свойства ионообменных смол для ВЭЖХ

Наименование	Производитель*	Размер частиц, мкм	Функциональная группа	Ионообменная емкость (в сухом состоянии) ммоль экв/г	Примечания
Аминекс А-27	28	12-15	-(NH ₃) ⁺	3,2	Степень свивки 8%; для разделения углеводов, пуриновых оснований, нуклеотидов
А-28		7-11			Степень свивки 2, 4, 8, 12%, влажность 50%
А-29		6-9			
АН-X	16	11	-(NMe ₃) ⁺ Cl ⁻	4	
Хромекс		11-12	-(NMe ₃) ⁺	4	

Наименование	Производитель*	Размер заст. мкм	Функциональная группа	Ионообменная емкость (в сухом состоянии) ммоль экв/г	Примечания
Гамильтон НА	19;9	7-10	-(NR ₃) ⁺ Cl ⁻	5	Степень сшивки 4, 6, 8 или 10%
Ионекс SB	6	5-20	-(NR ₃) ⁺ Cl ⁻	3	Степень сшивки 7%, влажность 50%
Сферон ДЕАЕ 300		12, 16, 20	-N(C ₂ H ₅) ₂	1,5	
Аминек А-5	28	11-15	(SO ₃) ⁻	5	Степень сшивки 8%
А-7		7-11			Для разделения аминокислот
А-8		5-8			
А-9		11-12			
Бекман АА-20	1	10-12	-(SO ₃) ⁻	5	То же
АА-15		11			
Хромекс Катлон	53	11	-(SO ₃) ⁻	5	Степень сшивки 8 или 12%
Даррум ДС А	54	14	-(SO ₃) ⁻	5	Степень сшивки 8%
4А		9			Для анализа аминокислот
5А		6			
6А		11			
Гамильтон НС	19;9	7-10	-(SO ₃) ⁻	5,2	Степень сшивки от 2 до 35%
Ионекс SA	6	10	-(SO ₃) ⁻	3	Степень сшивки 8%, влажность 35%
Сферон микро С 300		12, 16, 20	COOH	2,0	
Сферон В 300		»	-(SO ₃) ⁻	1,5	

Примечание. Первые шесть смол — анионообменные, остальные — катионообменные. Подложка — сополимер стирола с дивинилбензолом.

* Номер см. в Приложении 7.

1.3. Свойства ионообменных силикагелей для ВЭЖХ

Наименование	Производитель*	Размер частиц, мкм	Материал подложки	Функциональная группа	Ионообменная емкость (в сухом состоянии) ммоль экв/г	Примечание
Анионообменные						
Хромексбид SAX	50	10	Лакросорб	-(NMe ₃) ⁺	< 0,55	Диапазон рН=1-9 Диапазон рН=1,5-7,5 Для разделения нуклеотидов или готовых колонн Нуклеотиды или готовые колонны Может использоваться при работе с органическими веществами рН=2-9. Для разделения нуклеотидов Слабый ионообменник
Даррум AN	7	10	Лакросорб	-(NMe ₃) ⁺ Cl ⁻	1	
Ионекс SB	6	5, 10	Нуклосил	-(NR ₃) ⁺ (H ₂ PO ₄)	< 1	
Партиял SAX	2	10	Партиял	-(NMe ₃) ⁺	< 1	
RSL Аллон	9	5, 10, 15	RSL Силикагель	-(NMe ₃) ⁺ Cl ⁻	< 1	
Выдак TP Аллон	10	10	Выдак Si	-(NR ₃) ⁺	< 1	
Зорбак SAX	3	6	Зорбак Сил	-(NMe ₃) ⁺	< 1	
Нуклосил NMe ₂	6	5, 10	Нуклосил 100 А	-(NMe ₃) ⁺	< 1	
Даррум КАТ	7	10	Лакросорб	-(SO ₃) ⁻ H ⁺	1,2	
Ионекс SA	6	5, 10	Нуклосил	-(SO ₃) ⁻ (NH ₄) ⁺	1	
Партиял SCX	2	10	Партиял	-(SO ₃) ⁻ H ⁺	≈ 1	
Выдак TP Катлон	10	10	Выдак TP	-(SO ₃) ⁻ H ⁺	≈ 1	
Зорбак SCX	3	10	Зорбак Сил	-(SO ₃) ⁻ H ⁺	≈ 1	
Катионообменные						

* Номер см. в приложении 7.

1.4. Свойства полужестких сорбентов для эксклюзионной ВЭЖХ

Наименование, материал	Размер частиц, мкм	Диапазон проницаемости для предел эксклюзии	N ² , тыс. т. т./м	Давление, МПа	Температура, °С	Скорость потока, мл/мин	Рекомендуемые растворители	Проницаемость, $\bar{\phi}$	Примечания
μ-Стирогель (сополимер стирола с дивинилбензолом)	10±1	10—700 ^a	13	14		3	Органические растворители умеренной полярности*	13	Готовые колонки 300×7,8 мм заполнены в толуоле
100 А		5·10 ² —10 ⁴	10	21	150	3			
500 А		10 ³ —2·10 ⁴	10	21	150	3			
10 ³ А		10 ⁴ —2·10 ⁵	10	21	150	3			
10 ⁴ А		10 ⁵ —2·10 ⁶	10	21	150	3			
10 ⁵ А		10 ⁶ —<2·10 ⁷	10	21	150	3			
Ультрастирогель (сополимер стирола с дивинилбензолом)	<10	10—10 ^{2a}	33		40	То же	13	То же	
100 А		10 ² —10 ⁴	46		150				
500 А		10 ³ —3·10 ⁴	46		150				
10 ³ А		10 ⁴ —10 ⁵	46		150				
10 ⁴ А		10 ⁵ —10 ⁶	46		150				
10 ⁵ А		<10 ⁷	46		150				
Ультрастирогель ТГФ (сополимер стирола с дивинилбензолом)	<10	40—1,5·10 ^{3 a}	40			ТГФ	13	Готовые колонки 300×7,8 мм Заполнены в ТГФ	
100 А		10 ² —10 ⁴	40						
500 А		2·10 ² —3·10 ⁴	40						
10 ³ А		5·10 ² —6·10 ⁴	40						
10 ⁴ А		5·10 ⁴ —4·10 ⁶	40						
10 ⁵ А		2·10 ⁵ —10 ⁷	40						
линейная*		5·10 ² —8·10 ⁶	40						
							Линейный диапазон 2·10 ² —4·10 ⁶		

μ-Сферогель (сополимер стирола с дивинилбензолом)	10	50—2·10 ^{3 a}	18	11	140	2	Органические растворители умеренной полярности*	1	Готовые колонки 300×7,8 мм Заполнены в толуоле
50 А		10 ² —5·10 ³	18	11	140	2			
100 А		5·10 ² —10 ⁴	18	11	140	2			
500 А		10 ³ —5·10 ⁴	18	11	140	2			
10 ³ А		10 ⁴ —5·10 ⁵	18	11	140	2			
10 ⁴ А		10 ⁵ —5·10 ⁶	18	11	140	2			
10 ⁵ А		10 ⁶ —10 ⁷	18	11	140	2			
Шодекс (сополимер стирола с дивинилбензолом)	10	10—10 ^{3 a}	32	1,5		2	ТГФ, толуол, хлороформ, метиленхлорид	18	Готовые колонки 250×8 мм и 500×8 мм (без индекса «S»). Индекс перед номером указывает растворитель в колонке: А—ТГФ; АС—CHCl ₃ ; АТ—толуол; АД—ДМФА. Типичный перепад давлений на колонке 250 мм в ТГФ (1 мл/мин) 0,5 МПа. Имеются препаративные колонки 500×20 мм
А-801/S		10 ³ —10 ³	32	1,5		2			
А-802/S		10 ² —2·10 ⁴	32	1,5		2			
А-802,5/S		2·10 ² —7·10 ⁴	32	1,5		2			
А-803/S		10 ³ —5·10 ³	30	1,5		2			
А-804/S		10 ⁴ —5·10 ⁶	30	1,5		2			
А-805/S		10 ⁵ —5·10 ⁷	30	1,5		2			
А-806/S		10 ⁶ —10 ⁷	16	1,5		2			
А-807/S		10 ³ —5·10 ⁷	30	1,5		2			
А-80M/S ^b									
Шодекс (сополимер стирола с дивинилбензолом)	6±2	10 ² —1,5·10 ^{3 a}	53	3,5			ТГФ. Замена не рекомендуется	18	Готовые колонки 300×8 мм, заполнены в ТГФ
КF-801		10 ² —5·10 ³	53	3,5					
КF-802		10 ² —2·10 ⁴	53	3,5					
КF-802,5		10 ² —7·10 ⁴	53	3,5					
КF-803									

Наименование, материал	Размер, частота, мм	Диапазон пропускности или предел эксклюзии	N ² , тыс. т./м	Давление, МПа	Температура, °С	Скорость потока, мл/мин	Рекомендуемые растворители	Проводимость	Примечания
KF-804		10 ³ —4·10 ⁴	53	3,5					
KF-805		4·10 ⁴	33	3,5					
KF-806		4·10 ⁷	33	3,5					
KF-80M		4·10 ⁷	40	3,5					
TSK-гель (сополимер стирола с дивинилбензолом)	8—10								
G1000H		10 ³ ^a	26,20		<60	3	ТГФ ТГФ толуол, хлорированные углеводороды	12	Готовые колонки 300×7,5 мм и 600×7,5 мм заполнены в ТГФ
G2000H		10 ⁴	26,20	15	<60	3			
G2500H		2·10 ⁴	26,20	15	140	3	То же + ДМФА, метилэтилкетон, ацетон		Перепад давлений на колонке 30 см в ТГФ (1 мл/мин) 1,2—1,8 МПа, имеются препаративные колонки 600××21,5 мм.
G3000H		6·10 ⁴	26,20	15	140	3			
G4000H		4·10 ⁵	26,20	15	140	3			
G5000H		4·10 ⁶	20	15	140	3			
G6000H		4·10 ⁷	20	15	140	3			
G7000H		4·10 ⁸	20	15	140	3			
GMH ^a		4·10 ⁸	20	15	140	3			
TSK-гель (сополимер стирола с дивинилбензолом)	<8								
G1000 HXL		10 ³ ^a	50						
G2000 HXL		10 ⁴	50						
G2500 HXL		2·10 ⁴	50						
G3000 HXL		6·10 ⁴	50						
G4000 HXL		4·10 ⁵	50						
G5000 HXL		4·10 ⁶	26						
G6000 HXL		4·10 ⁷	26						
G7000 HXL		4·10 ⁸	26						
GMH XL ^a		4·10 ⁸	26						

GMH HT ^a		4·10 ⁸	15		140		o-Дихлорбензол		Готовые колонки 300×7,8 мм и 600×7,5 мм для высокотемпературного анализа полиолефинов
Микрогель 10 (сополимер стирола с дивинилбензолом)	10								
50 A		2·10 ³ ^a	25	15	140	3	Органические растворители умеренной полярности ^a	16	Готовые колонки 250×7,7 мм и 500×7,7 мм. Перепад давлений менее 2,5 МПа при скорости потока ТГФ 1 мл/мин
100 A		4·10 ³	25	15	140	3			
500 A		2·10 ⁴	25	15	140	3			
10 ³ A		4·10 ⁴	25	15	140	3			
10 ⁴ A		4·10 ⁵	25	15	140	3			
10 ⁵ A		4·10 ⁶	25	15	140	3			
10 ⁶ A		4·10 ⁷	25	15	<120	3			
Микрогель (сополимер стирола с дивинилбензолом)	5						Растворители умеренной полярности ^a	16	Готовые колонки 250×7,7 мм и 500×7,7 мм. Перепад давлений в ТГФ (1 мл/мин) менее 5 МПа.
550 A		2·10 ³ ^a	40	10	45	1,5			
100 A		4·10 ³	40	10	45	1,5			
500 A		2·10 ⁴	40	10	45	1,5			
Сферон микро 300 A	12, 16, 20	3·10 ⁵ ^b			200				
Сферон (сополимер 2-гидроксиэтилметакрилата с этилендиметакрилатом)	<25						Водные системы, буферные растворы, полярные органические растворители	4	Устойчивы при pH 1—12. Предел проникновения для всех марок одинаков (~10 ³)
40		(2—6)·10 ⁴ ^b		~10	200				
100		(7—25)·10 ⁴		~10	200				
300		(26—70)·10 ⁴		~10	200				
1000		(8—50)·10 ⁵		~10	200				
10000		10 ⁶		~10	200				

Наименование, материал	Размер частиц, мкм	Диапазон проницаемости или предел эксклюзии	N ² , тыс. т./м	Давление, МПа	Температура, °С	Скорость потока, мл/мин	Рекомендуемые растворители	Производитель	Примечания
Шодекс ОН-Пак (поливиниловый спирт)									
Q801/S	≤ 10	1,8 · 10 ³ ^б	3	50			Водные системы, буферные растворы	18	Готовые колонки 250×8 мм и 500×8 мм (без индекса «S»)
Q802/S		7 · 10 ³ ^б	2	50					
		5 · 10 ³ ^б 1,5 · 10 ³ ^в							
Полиглицидилметакрилат									
B803/S		10 ³ ^б , 2 · 10 ³ ^в	1,6	> 50					Оптимальная температура разделения 50 °С. Имеются препаративные колонки 500×20 мм
B804/S		5 · 10 ³ ^б , 2 · 10 ³ ^в	1,6	> 50					
B805/S		5 · 10 ³ ^б ; 2 · 10 ³ ^в	3	> 50					
B806/S		2,5 · 10 ³ ^б ; 10 ³ ^в	3	> 50					
Шодекс Ионпак (сульфированный сополимер стирола с дивинилбензолом)									
KS801	≤ 10	10 ³ ^б		> 80			Деионизованная вода, буферные растворы	18	Серия KS — готовые колонки 300×8 мм. Серия S — готовые колонки 250×8 мм и 500×8 мм (без индекса «S») Оптимальная температура разделения 40—80 °С.
KS802		10 ⁴		> 80					
KS803/S		5 · 10 ⁴		> 80					
S804/S		5 · 10 ³		> 80					
S805/S		5 · 10 ⁴		> 80					
S806/S		5 · 10 ⁷		> 80					

TSK-гель									Имеются препаративные колонки 500×20 мм сорбентами KS801 и S804.
G2000 PW	10±2	5 · 10 ³ ^в	16				Водные системы, буферные растворы	12	Готовые колонки 300×7,5 мм и 600×7,5 мм. Пористый полимерный гель, содержит на поверхности ОН-группы. Устойчив при pH = -2—12. Имеются препаративные колонки 600×21,5 мм
G2500 PW	10±2		16						
G3000 PW	13±2	5 · 10 ³ ^б ; 10 ⁴ ^в							
G4000 PW	13±2	10 ³ —7 · 10 ³ ^б	10						
		2 · 10 ³ —3 · 10 ³ ^в							
G5000 PW	17±2	10 ⁴ —2 · 10 ⁴ ^б	10						
		4 · 10 ³ —8 · 10 ³ ^в							
G6000 PW	25±5	10 ³ —2 · 10 ³ ^в	10						
		4 · 10 ³ —8 · 10 ³ ^в							
GM PW*		10 ³ —5 · 10 ³ ^в	10						
G2500 PWXL		5 · 10 ³ ^в	46						
G3000 PWXL		8 · 10 ⁴	46						
G4000 PWXL		5 · 10 ³	33						
G5000 PWXL		10 ⁴	33						
G6000 PWXL		10 ⁴	23						
CMPW XL*		10 ³ —10 ⁶	23						
G-oligo—PWXL			46				Для анализа олигомеров		
G-DNA—PWXL			46				Для анализа различных ДНК		

^а По полистиролу; ^б По декстрану; ^в По полиэтиленгликолю; ^г Гарантированная эффективность; ^д Смесок фирм-производителей. см. табл. 7; ^е Эти растворители отмечены звездочкой в приложении 2.1; ^ж Смешанный гель; ^з Смешанный гель типов 803—807; ^и Смешанный гель типов G3000H-G7000H. Давление, температура, скорость потока — максимально допустимые значения.

1.5. Свойства жестких сорбентов для эксклюзионной ВЭЖХ

Наименование	Размер частиц, мкм	Размер пор, нм	Объем пор, мл/г	Удельная поверхность, м ² /г	Диапазон проницаемости или предел эксклюзии	Предельное давление, МПа	Производитель	Примечания
Лихросфер Si-100	5,10	10	1,2	370	10 ³ —7·10 ⁴ Å	20	7	Необработанные сферические частицы
Si-300	10	30	2,0	250	2·10 ³			
Si-500	10	50	0,8	50	5·10 ² —5·10 ³			
Si-1000	10	100	0,8	20	10 ² —3·10 ³			
Si-4000	10	400	<0,8	6	5·10 ¹ —7·10 ²			
Зорбакс SE-60	6	6	0,6	400	10 ² —4·10 ⁴ Å	20	3	Готовые колонки 250×6,2 мм. Необработанные сферические частицы
SE-100	10	10	1,2	370	5·10 ² —7·10 ⁴			
SE-500	10	50	0,8	50	3·10 ² —5·10 ³			
SE-1000	10	100	0,8	20	10 ² —3·10 ³			
Зорбакс PSM-60	6	6	0,6	400	10 ² —10 ⁴ Å			
PSM-500	6	35	0,6	60	10 ² —5·10 ³	20	3	Готовые колонки 250×6,2 мм Гарантированная эффективность 40 тыс. т.т/м Необработанные или силицированные сферические частицы. Набор PSM-60+ +PSM-1000 имеет линейную калибровку
PSM-1000	6	75	0,6	15	3·10 ¹ —2·10 ²			
Порасил GPC-60	10	6		500	10 ² —10 ⁴ Å	20	13	Необработанные сферические частицы
Силикагель KCC-3		6—8	0,76—0,90	450—600			СССР	ТУ 38.401389—82
C-3		7—12	0,90—1,05	350—500				
KCC-2,5		9—11	0,9—1,1	350—450				
KCC-2		12—15	1,0—1,25	260—350				

Силикагель KCK-1		20—50	1,0—1,25	250				ТУ 38.401484—83 В марках с дополнительным индексом «ХС» нормируется растворимость кремнезема — не более 0,05%
MCA-750		40—100	0,8	40—90				
MCA-1500		110—180	>0,8	20—38				
MCA-2500		190—300	0,7	10—20				
Силохром С-80		48—55	1,4	100				
CX-3		80—85	1,7	30				
μ-Бондагель E-125	10±1	12,5			2·10 ³ —2·10 ⁴ Å	20	13	Готовые колонки 300×3,9 мм Поверхность модифицирована эфирными группами. Любые растворители от пентана до буферных систем с pH=2—8
E-300	10±1	30			3·10 ² —10 ³			Смесь сорбентов. Дает линейную калибровку
E-500	10±1	50			5·10 ² —5·10 ³			
E-1000	10±1	100			5·10 ² —2·10 ³			
E-High A	10±1				1,5·10 ² —7·10 ³			
E-линейная	10±1				2·10 ² —2·10 ³			
Гликофаз G/CPG-40	5—10	6	>0,12	190	10 ² —8·10 ³ Å		8	
G/CPG-100	5—10	10	>1,0	170	10 ² —3·10 ⁴			
G/CPG-250	5—10	25		130	2,5·10 ² —1,3·10 ⁴			
G/CPG-550	5—10	55		70	10 ² —3,5·10 ⁴			
G/CPG-1500	5—10	150		40	10 ² —10 ⁴			
G/CPG-2500	5—10	250		10	2·10 ² —1,5·10 ⁴			
Синхропак GPC-100	10				10 ² —10 ⁴ Å		11	Поверхность модифицирована глицерильными группами. Для анализа белков, ферментов и водорастворимых полимеров Растворители: водные системы, полярные органические растворители
GPC-1000	10				5·10 ² —10 ⁴			
GPC-300	10				6·10 ² —6·10 ³			
GPC-500	10				10 ² —>10 ³			
GPC-4000	10							

Наименование	Размер частиц, мкм	Размер пор, нм	Объем пор, мл/г	Удельная поверхность, м ²	Диапазон проницаемости или предел исключения	Пределное давление, МПа	Проводимость ²	Примечания
Лихросфер Si100	5, 10				10 ³ -8·10 ⁴ ^б	20	7	Готовые колонки 250×4 мм. Поверхность модифицирована глицерильными группами. Для анализа биополимеров. Потери ферментов 10%, рН=2-8
Диол	10				2,5·10 ³ -5·10 ³			
Si 500 Диол	10				4·10 ³ -10 ⁴			
Si 1000 Диол	10				>10 ⁴			
TSK-гель								Готовые колонки 300×7,5 мм и 600×7,5 мм. Поверхность покрыта ОН-группами. Гарантированная эффективность 16 тыс. т.т/м. Для анализа биополимеров и водорастворимых полимеров, рН=2,8-7,5, максимальная температура 45°C. Оптимальная скорость потока 0,9-1,2 мл/мин, максимальная - 1,5 мл/мин. Имеются препаративные колонки 300×21,5 мм и 600×21,5 мм
2000 SW	10±2				5·10 ³ -6·10 ⁴ ^б		12	
3000 SW	10±2				2,5·10 ³ -2·10 ³ ^б			
4000 SW	13±2				10 ³ -3·10 ³ ^б 10 ³ -10 ³ ^б 5·10 ³ -10 ³ ^б 5·10 ³ -4·10 ³ ^б			

Примечания: ^а По полистиролу; ^б по декстрану; ^в по белкам.
² Номер см. в Приложении 1.

2. СВОЙСТВА ОСНОВНЫХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ ДЛЯ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Растворитель	Граничная длина волны УФ-детектора, нм	Показатель преломления, n _D ²⁰	T, кип, °C	Плотность, д ₄ ²⁰	Вязкость, МПа·с (20°C)	Электропроводящая сила для Al ₂ O ₃ , ε ²	Полярность, ρ ²	Диэлектрическая проницаемость, ε (20°C)	Группа селективности	Температура вспышки, °C	ПДК, мг/м ³	Пределы взрываемости, % (объемн.)
n-Пентан	195	1,357	36	0,626	0,24	0,00	0,0	1,84	-	~ -40		
n-Гексан	195	1,375	69	0,659	0,33	0,01	0,1	1,88	-	-20		1,1-6,7
n-Гептан	195	1,388	98	0,684	0,42	0,01	0,2	1,92	-	-4		1,1-6,0
2,2,4-Триметилаптан (изоктан)	200	1,391	99	0,692	0,50	0,01	0,1	1,94	-	-9		0,95-6,0
Циклогексан	200	1,426	81	0,779	0,98	0,04	-0,2	2,02	-	-17	80	-
Тетрагидрид углерода*	265	1,460	77	1,595	0,97	0,18	1,6	2,24	-	-	250	-
Диизопропиловый эфир	220	1,369	68	0,726	0,37	0,28	2,4	3,9	I	-28	50	1,4-21
Толуол*	285	1,497	111	0,867	0,59	0,29	2,4	2,4	VII	4	50	1,3-6,7
Хлорбензол*	280	1,525	132	1,107	0,80	0,30	2,7	5,6	VII	29	5	1,3-7,1
Бензол*	290	1,501	80	0,879	0,65	0,32	2,7	2,3	VII	-12	300	1,4-7,1
Диэтиловый эфир	220	1,353	35	0,714	0,23	0,38	2,8	4,3	I	-43		1,8-48,0
Метил-трет-бутиловый эфир	210	1,376	54	0,738		-0,38	-2,8		I	-10		
Хлороформ*	245	1,447	61	1,483	0,57	0,40	4,1	4,8	VIII	-	20	-
Метилэтиловый эфир*	240	1,424	40	1,336	0,44	0,42	3,1	8,9	V	14	50	12,1-22,0
Тетрагидрофуран*	220	1,408	66	0,889	0,52	0,45	4,0	7,6	III	-20	100	1,8-11,8
1,2-Дихлорэтан*	230	1,445	83	1,253	0,79	0,49	3,5	10,4	V	13	200	6,2-16,9
Метилциклопентан	330	1,379	80	0,806	0,40	0,51	4,7	18,5	VI	-3	10	2,6-10,2
Диоксан*	220	1,423	101	1,034	1,54	0,56	4,8	2,2	VI	12	10	2,6-22,5
Ацетон	330	1,359	56	0,791	0,32	0,56	5,1	21,4	VI	-18	200	2,9-12,8
Этилацетат	260	1,372	77	0,901	0,45	0,58	4,4	6,0	VI	-3	10	2,2-0,4
Ацетонитрил	190	1,344	82	0,786	0,37	0,63	5,8	37,5	VI	6	10	-
Изопропанол	210	1,378	82	0,785	2,3	0,82	3,9	20,3	II	13	980	2,33(нижний предел)
Этанол	210	1,361	78	0,789	1,20	0,88	4,3	24,6	II	13	1000	3,3-19
Метанол	205	1,329	65	0,792	0,69	0,95	5,1	32,7	II	11	5	6,7-36,5
N,N-Диметилформамид	270	1,427	153	0,942	0,92		6,4	36,7	III	58	10	2,2-15,2
Вода	290	1,333	100	0,998	1,00	большая	10,2	80	VIII	-	-	-
Уксусная кислота	230	1,373	118	1,049	1,26	большая	6,0	6,2	IV	34	5	3,3-22
o-Дихлорбензол*	295	1,549	180	1,305	1,26					66	20	2,2-9,2
1,2,4-Трихлорбензол*	310	1,572	213	1,454	0,5					99	10	-
m-Крезол*	305	1,540	203	1,034	(135°C) 20,8		7,4	11,8	VIII	86	0,5	-

Примечание: Растворители, отмеченные звездочкой, совместимы с большинством полужестких сорбентов для эксклюзионной хроматографии.

3. ПРИМЕНИМОСТЬ РАСТВОРИТЕЛЕЙ ДЛЯ ЭКСКЛЮЗИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ РАЗЛИЧНЫХ ПОЛИМЕРОВ [20]

Полимер	Толуол	Хлороформ	1,2-дхлорэтан или 1,1,2-трихлорэтан	Тетрагидрофуран	Диметилформамид	м-Крезол	Вода
Алкидные смолы	+	+		•	+		—
Ацетилацеллоза		—		•			•
Биополимеры	+	—	+	•			•
Бутилкаучук	+	—					•
Декстрины		—					•
Каучук натуральный	+	—		—			
Лигнины	—	—			+		
Лигносультфонаты	—	—					•
Нитроцеллюлоза				+			—
Полиалкиленгликоли	+	+	+	+			
Полиакрилаты	+			+		+	—
Полиакрилонитрил					•		
Полиамидокислоты					•		
Полиамиды			—			•	—
Полибутадиены	+		+	+			—
Поливинилацетат		+		+	+		—
Поливинилбутираль				+	+		—
Поливиниловые эфиры	+			+	+		—
Поливиниловый спирт					+		•
Поливинилпирролидон		+					+
Поливинилхлорид	+				•		—
Полидиметилсилоксан	•	•	+	•			—
Полиизобутилен	+	+		+			—
Полиизопрен	+	+	+	+			—
Полиизоцианаты	+	+		•	+		—
Поликарбонаты			+	•			—
Полиметилметакрилат	+		+	+	+	+	—
Полипропилен	—		•	—	—	—	—
Полисилоксаны	•	+	+	+			—
Полистирол	+	+	+	•	+	+	—
Полиуретаны				•		+	—
Полихлоропрен	•					+	—
Полиэлектролиты				+			+
Полиэтилен	—	—	+	—	+		—
Полиэтиленгликоль		+	•	•	+	+	—
Полиэтилентерефталат	+			+	+	•	—
Полиэфиры		+		+		+	—
Сополимеры							
Акрилонитрил-бутадиенстирольные				+	•		—
Акрилонитрил-бутадиеновые	+		+		+		—
Акрилонитрил-стирольные				+	•		—
Бутадиен-акриловые	+				+		—
Бутадиен-стирольные	+		+	•			—
Изопрен-стирольные	+		+	+			—
Стирол-метилметакрилатные	+			+	+		—
Этилен-винилацетатные	•	+	•	+			—
Этилен-пропиленовые			+				—

Продолжение

Полимер	Толуол	Хлороформ	1,2-дхл. или 1,1,2-трихлорэтан	Тетрагидрофуран	Диметилформамид	м-Крезол	Вода
Карбамидно-формальдегидные смолы				•			—
Фенолформальдегидные смолы			+	+			
Эпоксидные смолы	+	+		•			—

Примечания: + — пригоден; — — непригоден; • — наиболее употребителен.

4. КОНСТАНТЫ K_{η} И a В УРАВНЕНИИ МАРКА—КУНА—ХАУВИНКА

Полимер	Растворитель	Температура, °C	Константы для полимера		Используемые константы для полистирола		Диапазон мол.-масс, $M \cdot 10^{-3}$
			$K_{\eta} \cdot 10^4$	a	$K_{\eta} \cdot 10^4$	a	
Полистирол	Тетрагидрофуран	23	68,0	0,766	—	—	>3
Полистирол		25	1,60	0,706	—	—	50—1000
Полистирол гребнеобразный	€	23	2,2	0,56	1,68	0,69	150—11200
Полистирол звездчатый	€	23	0,35	0,74	1,68	0,69	150—600
Амлоза ацетат	€	25	108,0	0,70			20—500
Амлоза бутират	€	25	111,0	0,70			20—500
Амлоза пропионат	€	25	248,0	0,61			20—500
Бутилкаучук	€	25	0,85	0,75	1,25	0,717	4—4000
Каучук натуральный (поли-цис-изопрен)	€	25	1,09	0,79	1,0	0,70	10—1000
Каучук стирол-бутадиеновый (25% стирола)	€	40	3,18	0,70	1,9	0,68	70—1000
Каучук стирол-бутадиеновый (25% стирола)	€	25	4,1	0,693	1,25	0,717	24—40
Нитроцеллюлоза	€	25	25,0	1,0	68,0	0,766	95—2300
Полибутадиен-1,2	€	20	$M_n(PIS)=0,167$	$M_n(PIS)$			9—25
Полибутадиен-1,4	€	40	5,78	0,67	1,9	0,68	10—100
Полибутадиен-1,4 (цис/транс ≈ 0,8)	€	25	76,0	0,44	1,68	0,69	270—550
8% винил	€	25	4,57	0,693	1,25	0,717	80—1100
20% винил	€	25	4,51	0,693	1,25	0,717	20—200
50% винил	€	25	4,28	0,693	1,25	0,717	20—200
73% винил	€	25	4,03	0,693	1,25	0,717	20—200
Полибутилизонцианат	€	20	0,0457	1,18			18—210
Поливинилацетат	€	25	3,5	0,63	1,17	0,725	10—1000

Полимер	Растворитель	Температура, °C	Константы для полимера		Использованные константы для полистирола		Диапазон мол. масс. $M \cdot 10^{-3}$
			$K_{\eta} \cdot 10^4$	a	$K_{\eta} \cdot 10^4$	a	
Поливинилхлорид	Тетрагидрофуран	23	1,63	0,766	1,60	0,706	20—170
		25	1,50	0,77	1,22	0,72	20—105
		25	1,60	0,77	1,17	0,725	10—1000
		23	7,2	0,61	1,68	0,69	27—100
		20	1,051	0,848			20—150
Полигексен-1	«	25	0,499	0,83			30—400
Полидодецил-метакрилат	«	25	0,655	0,70			150—3000
Полиизопрен	«	25	1,77	0,735	1,25	0,717	40—500
Поликарбонат	«	25	3,99	0,77			
Полиметилметакрилат	«	23	0,93	0,72	1,68	0,69	170—1300
Полиоктадецил-метакрилат	«	30	0,25	0,75			230—1670
Полипропиленоксид	«	20	5,5	0,62			0,5—3,3
Полихлоропрен	«	30	0,418	0,83			69—511
Полиэпихлоргидрин	«	30	0,155	0,89			30—400
Сополимеры							
Акрилонитрил — стирол (38,3 : 61,7)	«	25	2,15	0,68			100—780
Винилхлорид — винилацетат (85 : 15)	«	25	1,87	0,746			10—100
Стирол — малеиновый ангидрид (50 : 50)	«	30	0,507	0,81			130—760
Полистирол	<i>o</i> -Дихлорбензол	135	1,38	0,70			2—900
Полиэтилен	«	135	4,77	0,70	4,57	0,606	6—700
Полиэтилен высокого давления	«	135	5,046	0,693	1,51	0,693	10—1000
Полиэтилен низкого давления	«	138	5,06	0,70	1,38	0,70	0,2—200
Полибутадиен	«	135	2,7	0,746	1,51	0,693	10—500
Полипропилен	«	135	1,30	0,78	0,736	0,75	28—460
Полидиметил-силоксан	«	138	3,83	0,57	1,38	0,70	25—300
Полидиметил-силоксан	«	87	8,19	0,50	1,00	0,73	20—800
Полистирол	<i>m</i> -Крезол	135	2,02	0,65			4—2000
Полиамиды							
наилон 66	«	130	0,40	1,00	0,846	0,715	8—24
наилон 6	«	25	32	0,62			0,5—5
наилон 610	«	25	1,35	0,96			8—24
Полипирролидон	«	25	3,98	0,77			10—300
Полиэтилентерефталат	«	135	1,75	0,81	2,02	0,65	2,7—32
Полистирол	«	135	2,0	0,90	2,02	0,65	045—0,80
Полистирол	1,2,4-Трихлорбензол	130	2,80	0,64			50—900
Полипропилен	«	130	0,74	0,83	2,80	0,64	50—800
Полиэтилен	«	130	6,14	0,67	2,80	0,64	20—200

Компоненты и параметры	Варианты	Фирмы-производители														
		Бекман	Дюпон	Жилсон	Хьюлетт Пакард	Джаско	ЛДЦ	ЛКБ	Фармация	Шевелю	Спектра-Финкс	Варья	Уолерс	Калуур	Брукер	Иско
Вариант системы	Моноблок	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Масштаб работы и разделения	Блоки	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Микроколоночный	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Аналитический	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Полупрепаративный	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Управляющий компьютер	Препаративный	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Полупромышленный	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Типы подачи растворителя и насоса	Специальный	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Общего типа	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Градиент низкого давления	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Градиент высокого давления	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Детекторы	Рецикл растворителя	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Однопоршневой	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Двухпоршневой	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Трехпоршневой	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Шприцевой	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Система расчета	УФ-фильтровый	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	УФ-спектрофотометр	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Рефрактометр	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Флуориметр	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Колонки Сорбенты	Электрохимический	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	ИК-детектор	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Микрокомпьютер	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Интегратор	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

283

284

6. ЖИДКОСТНЫЕ ХРОМАТОГРАФЫ, СЕРИЙНО ВЫПУСКАЕМЫЕ В СТРАНАХ—ЧЛЕНАХ СЭВ, И ИХ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Модель хроматографа, производитель, страна	Характеристика насоса	Ввод пробы	Детектор, кювета	Примечания
«Миланхром», ПО «Научприбор», г. Орел, СССР	Шприцевой, 2,5 мл, 10 МПа, 2—600 мкл/мин, коррозионностойкий	С остановкой потока, 0,1—20 мкл	190—350 нм, 0,05—12,5 е. о. п., 1,5 мкл, 1,5 мм	Сканирование через 2 или 10 нм, время сканирования от 0,15 до 20 сек.
«Цвет-304», ДФ ОКБА, г. Дзержинск, СССР	Гидропневматический, 90 мл, 24 МПа, 150 мл/мин	С остановкой потока	254 нм, 0,01—1 е. о. п., 12 мкл, 15 мм	Термостат колонок, программируемые температуры
«Цвет-305», ДФ ОКБА, г. Дзержинск, СССР	Гидропневматический, 70 мл, 24 МПа, 150 мл/мин	Петлевой 5—100 мкл	Рефрактометр	Термостат колонок
«Цвет-306», ДФ ОКБА, г. Дзержинск, СССР	Электрохимический, 20 МПа, 0,1—5 мл/мин	Петлевой	190—600 нм, 0,01—1 е. о. п., 12 мкл	Термостат колонок, микрокювета на 3 мкл
«Цвет-3001», ДФ ОКБА, г. Дзержинск, СССР	Электрохимический, 20 МПа, 0,1—5 мл/мин	Петлевой	254 нм	Термостат колонок, заменит «Цвет-304»
«Цвет-3002», ДФ ОКБА, г. Дзержинск, СССР	Электрохимический, 20 МПа, 0,1—5 мл/мин	Петлевой	Рефрактометр	Термостат колонок 25—150 °С, расходомер, связь с ЭВМ для расчета ММР
«Цвет-3003», ДФ ОКБА, г. Дзержинск, СССР	Электрохимический, 20 МПа, 0,1—5 мл/мин	Петлевой	190—600 нм, 0,01—1 е. о. п.	Заменит «Цвет-306»
«Цвет-3004», ДФ ОКБА, г. Дзержинск, СССР	Электрохимический, 20 МПа, 0,1—5 мл/мин	Петлевой	Рефрактометр, УФ-детектор	Интегратор
«Цвет-3005», ДФ ОКБА, г. Дзержинск, СССР	Электрохимический, 0,03—5 мл/мин	Петлевой	Рефрактометр, УФ-детекторы	Ступенчатый градиент, термостат, интегратор, 2 самосципа
«Цвет-3006», ДФ ОКБА, г. Дзержинск, СССР	Электрохимический, 16 МПа, 0,5—5 мл/мин	Петлевой	Кондуктометр	Автоматизированная обработка данных
ХЖ-1309, СКБ АП АН СССР г. Ленинград, СССР	Шприцевой, 12 МПа, 0,5—30 мкл/мин, коррозионностойкий	Петлевой, 0,25—0,75 мкл	Лазерный рефрактометр, 0,1 мкл	Выпускается по заказу, микрогазхроматограф, микроколонок diam. 0,5 мм, автоматизированная обработка данных
LC-822, Ково, ЧССР	Электрохимический, 40 МПа, 0,2—5 мл/мин	С остановкой потока	200—400 нм, 0,01—1 е. о. п.	Разработаны петлевой инжектор, рефрактометр, электрохимический детектор, есть градиент
Лихохром МИМ, ВНР	2010, Лабор Электрохимический, 40 МПа, 0,1—10 мл/мин	Петлевой	200—400 нм, 0,01—1 е. о. п., 8 мкл	