

Е.Л.СТЫСКИН, Л.Б.ИЦИКСОН, Е.В.БРАУДЕ

**Практическая
Высокоэффективная
Жидкостная
ХРОМАТОГРАФИЯ**

Ознакомительная версия

**Москва.
1986**

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	5
Введение	6
ГЛАВА 1. ОСНОВЫ ТЕОРИИ И ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ ВЭЖХ	8
1.1. Эффективность и селективность	8
1.2. Размывание в колонке и вне ее	11
1.3. Удерживание и сила растворителя	13
1.4. Размер частиц сорбента, проницаемость и эффективность	14
ГЛАВА 2. КЛАССИФИКАЦИЯ МЕТОДОВ ВЭЖХ ПО МЕХАНИЗМУ РАЗДЕЛЕНИЯ	15
2.1. Адсорбционная хроматография	15
2.1.1. Адсорбционная хроматография на силикагеле	16
2.1.2. Адсорбционная хроматография на оксиде алюминия	18
2.1.3. Недостатки адсорбционной хроматографии, ограничивающие ее использование	19
.....	19
2.2. Распределительная хроматография	21
2.2.1. Нормально-фазная распределительная хроматография с привитыми фазами ..	23
2.2.2. Обращенно-фазная распределительная хроматография с привитыми фазами ..	29
2.2.3. Распределительная хроматография с нанесенными фазами	29
2.3. Ионообменная хроматография	29
2.3.1. Основы метода	34
2.3.2. Выбор подвижной фазы и условий разделения	35
2.3.3. Ионная хроматография	36
2.3.4. Практические рекомендации	38
2.4. Эксклюзионная хроматография	38
2.4.1. Основные понятия	41
2.4.2. Особенности аппаратуры	42
2.4.3. Выбор сорбента	44
2.4.4. Выбор растворителя	46
2.4.5. Исследование полимеров	54
2.4.6. Другие области применения	57
ГЛАВА 3. СПЕЦИАЛЬНЫЕ ВАРИАНТЫ ВЭЖХ	57
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	66
3.4.1. Получение производных до введения вещества в колонку	67
3.4.2. Получение производных после разделения в колонке	71
3.5. Ион-парная хроматография	79
3.6. Лигандообменная хроматография	81
3.7. Определение микропримесей	81
3.7.1. Общие положения	81
3.7.2. Предварительная подготовка образца и его ввод в хроматограф	82
3.7.3. Разрешающая способность колонки	82
3.7.4. Детекторы	83
3.7.5. Калибровочные графики	

<u>ГЛАВА 4. СОРБЕНТЫ ДЛЯ ВЭЖХ</u>	84
<u>4.1. Силикагель, его структура и химия поверхности</u>	84
<u>4.2. Оксид алюминия</u>	86
<u>4.3. Привитые сорбенты на основе силикагеля для нормально-фазной и обращенно-фазной хроматографии</u>	87
<u>4.4. Полимерные сорбенты для распределительной хроматографии</u>	97
<u>4.5. Сорбенты для эксклюзионной хроматографии</u>	98
<u>4.5.1. Полужесткие гели</u>	99
<u>4.5.2. Жесткие гели</u>	99
<u>4.6. Сорбенты для ионообменной хроматографии</u>	106
<u>ГЛАВА 5. ПРИГОТОВЛЕНИЕ, СОРБЕНТОВ И КОЛОНОК ДЛЯ ВЭЖХ</u>	108
<u>5.1. Получение узких фракций для ВЭЖХ из силикагеля для ТСХ и промышленного силикагеля КСК-2</u>	108
<u>5.2. Суспензионные методы приготовления колонок для ВЭЖХ</u>	110
<u>5.3. Заполнение колонок «сухим» методом</u>	117
<u>5.4. Тестирование и оценка качества приготовленных колонок</u>	117
<u>5.5. Хранение, регенерация и ремонт колонок для ВЭЖХ</u>	118
<u>ГЛАВА 6. ПОДВИЖНАЯ ФАЗА ДЛЯ ВЭЖХ</u>	123
<u>6.1. Основные требования к растворителям</u>	123
<u>6.2. Элюирующая сила растворителя и элюотропные ряды</u>	125
<u>6.3. Смеси растворителей</u>	126
<u>6.4. Селективность растворителя</u>	127
<u>6.5. Очистка растворителей для ВЭЖХ</u>	127
<u>ГЛАВА 7. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ПОДБОРА УСЛОВИЙ РАЗДЕЛЕНИЯ</u>	132
<u>ГЛАВА 8. АППАРАТУРА ДЛЯ ВЭЖХ</u>	135
<u>8.1. Насосы</u>	135
<u>8.2. Устройства для формирования градиента</u>	139
<u>8.3. Инжекторы</u>	142
<u>8.4. Детекторы для ВЭЖХ</u>	145
<u>8.4.1. Фотометры для работы в ультрафиолетовом и видимом диапазонах</u>	146
<u>8.4.2. Спектрофотометрические детекторы</u>	147
<u>8.4.3. Рефрактометрические детекторы</u>	148
<u>8.4.4. Флуориметрические детекторы</u>	150
<u>8.4.5. Другие детекторы</u>	151
<u>8.5. Системы регистрации и обработки данных</u>	155
<u>8.5.1. Самописцы</u>	155
<u>8.5.2. Интеграторы</u>	155
<u>8.6. Вспомогательные устройства для ВЭЖХ</u>	156
<u>8.6.1. Сосуды для подвижной фазы</u>	156
<u>8.6.2. Проточные фильтры</u>	156
<u>8.6.3. Устройства для измерения давления</u>	157
<u>8.6.4. Демпферы</u>	157
<u>8.6.5. Шприцы для ввода проб</u>	158
<u>8.6.6. Измерители скорости потока</u>	159
<u>8.6.7. Термостаты колонок</u>	160

<u>8.7. Конструкционные материалы для ВЭЖХ, требования к их химической стойкости и прочности</u>	160
<u>ГЛАВА 9. КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ</u>	164
<u>9.1. Идентификация веществ нехроматографическими методами</u>	167
<u>9.2. Спектральный анализ непосредственно в хроматографической системе</u>	169
<u>ГЛАВА 10. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ</u>	171
<u>10.1. Хроматографическое разделение</u>	171
<u>10.2. Измерение площадей или высот пиков</u>	172
<u>10.3. Расчет количественного состава смесей (методы калибровки)</u>	173
<u>10.4. Интерпретация полученных результатов</u>	175
<u>ГЛАВА 11. ОСОБЕННОСТИ ТЕХНИКИ ЭКСПЕРИМЕНТА В ВЭЖХ</u>	177
<u>11.1. Сборка хроматографической системы</u>	177
<u>11.1.1. Соединительные линии</u>	177
<u>11.1.2. Соединители и уплотняющие муфты</u>	178
<u>11.1.3. Резка и обработка концов капиллярных трубок</u>	181
<u>11.1.4. Особенности присоединения детектора</u>	182
<u>11.1.5. Запуск и герметизация системы</u>	183
<u>11.1.6. Типичные ошибки при сборке системы</u>	183
<u>11.2. Подготовка растворителя и пробы</u>	184
<u>11.2.1. Дегазация растворителя</u>	184
<u>11.2.2. Особенности работы с водными растворителями</u>	185
<u>11.2.3. Подготовка раствора пробы</u>	186
<u>11.2.4. Подготовка растворов полимерных образцов</u>	186
<u>11.3. Выбор варианта ВЭЖХ для анализа</u>	187
<u>ГЛАВА 12. ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО РЕМОНТУ, НАЛАДКЕ И ОБСЛУЖИВАНИЮ АППАРАТУРЫ ДЛЯ ВЭЖХ</u>	190
Свойства сорбентов для ВЭЖХ	----
Свойства основных растворителей для жидкостной хроматографии	----
Применимость растворителей для эксклюзионной хроматографии полимеров	----
<u>Основные поставщики аппаратуры</u>	205
<u>Библиографический список</u>	208

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 1985 г. 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 раство-

рители 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, поляризуемости 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

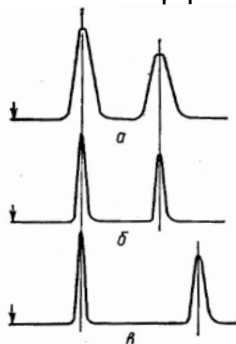
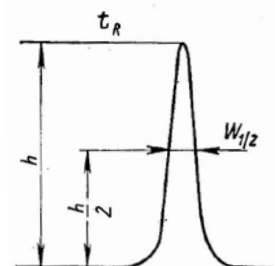


Рис. 1.1. Вид хроматограммы в зависимости от эффективности и селективности колонки: а — обычная селективность, пониженная эффективность (меньше теоретических тарелок), б — обычные селективность и эффективность; в — обычная эффективность, повышенная селективность (больше отношение времен удерживания компонентов)

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 хроматографического 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.

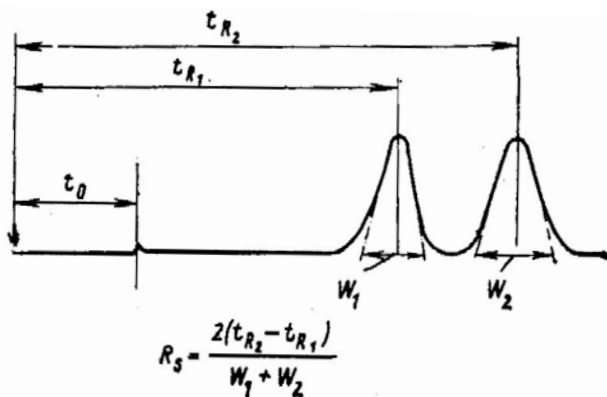


Рис. 1.2. Разрешение пиков и параметры удерживания

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:

$$k' = m_n / m_n$$

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

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

Разрешение, таким образом, определяется произведением трех сомножителей, 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 сомножитель 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 сомножителя 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, ес-

ли 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 удастся 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

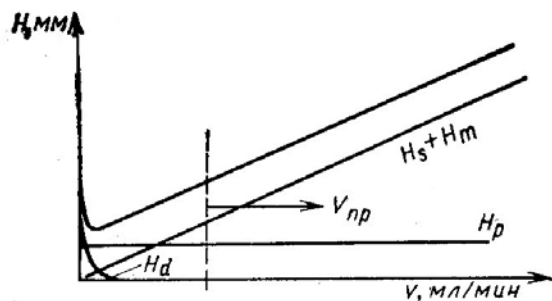


Рис. 1.4. Зависимость ВЭТТ от скорости подачи растворителя (V , мл/мин). Вклад в размывание пика разных факторов

колонки сорбентом. Величина H_d растёт 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, пред-колонки, 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 сис-

тем 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 разделениях 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 удастся 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 удастся 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:

$$\varphi = pd_c^2 t_o / \eta L^2$$

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 углеводов.

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 углеводов.

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

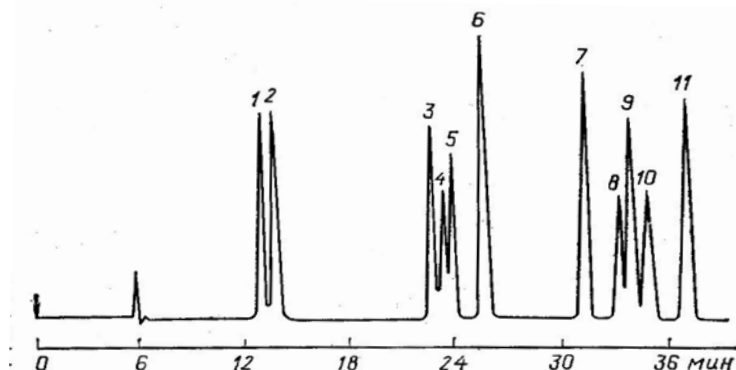


Рис. 2.1. Хроматограмма фенола, крезолов и ксиленолов, полученная на колонке размером 2х250х4.6 мм с зорбаксом Сил (6 мкм), подвижная фаза — гексан — метиленхлорид — изопропанол (100 : 10 : 1 по объему), расход 1 мл/мин, детектор — УФ (254 нм), проба 10 мкл: 1 — 2,4,6-триметилфенол; 2 — 2,6-ксиленол; 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

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.

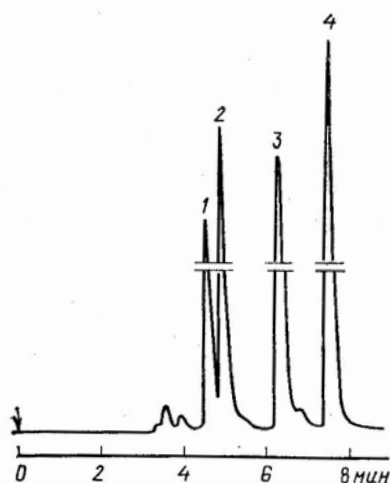


Рис. 2.2. Хроматограмма смеси аминных стабилизаторов полимеров, полученная на колонке размером 250х4,1 мм с силасорбом-600 (5 мкм), подвижная фаза — гексан — метиленхлорид — изопропанол — диэтил-амин (100:10:1:0,01 по объему), расход 1 мл/мин, детектор — УФ (254 нм), проба 2 мкл: 1 — фенол-β-нафтиламин; 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 — сульфокислота. *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 та-

ких 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, называемых 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 используются 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

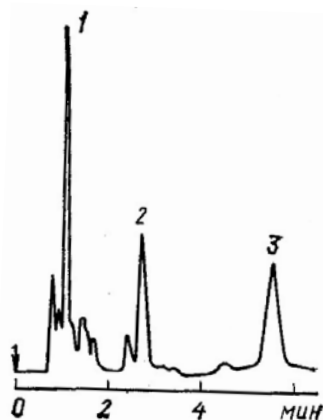


Рис. 2.3. Хроматограмма витаминов в пищевых продуктах, полученная на колонке размером 250x4 мм с нуклеосилом NH₂ (10 мкм), подвижная фаза — гептан — хлороформ (80:20 по объему), расход 3,5 мл/мин, детектор—УФ (254 нм), проба 5 мкл: 1 — уксусный эфир витамина А; 2 — витамин Е; 3 — витамин Д₃

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 aminoгруппами проявляют свойства слабых анионообменников.

Следует принимать во внимание и некоторые особенности применения сорбентов с aminoфазами. 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. Aminoфаза 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 aminoфазы 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 aminoфаз, 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.

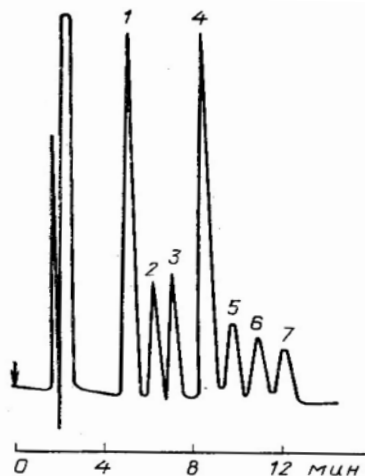


Рис. 2.4. Хроматограмма моносахаридов, полученная на колонке размером 250х4,6 мм с полигосилом 60 NH₂ (5 мкм), подвижная фаза — ацетонитрил — вода (75:25 по объему), расход 2 мл/мин, детектор — УФ (190 нм): 1 — рамноза; 2 — ксилоза; 3 — арабиноза; 4 — фруктоза; 5 — манноза; 6 — глюкоза; 7 — галактоза

Рис. 2.5. Хроматограмма цитохромов Ц разного происхождения, полученная на колонке размером 250х4 мм с нуклеосилом CN (5 мкм), подвижная фаза — 0,05 М раствор сульфата натрия в 0,1 М фосфатном буферном растворе (рН 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

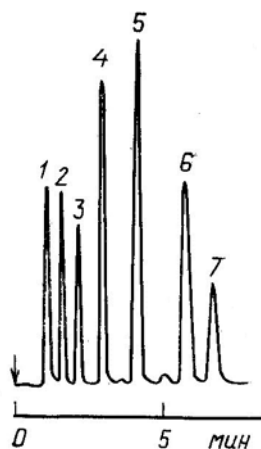
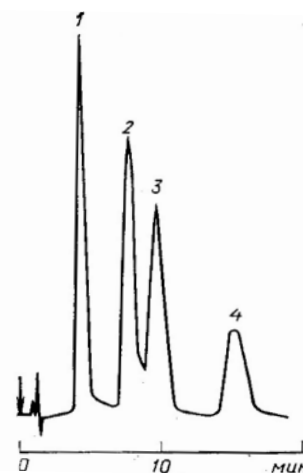


Рис. 2.6. Хроматограмма полициклических углеводородов, полученная на колонке размером 150х4,6 мм с нуклеосилом NO₂ (5 мкм), подвижная фаза — изооктан, расход 1,4 мл/мин, детектор УФ (254 нм), проба 20 мкл: 1 — бензол; 2 — нафталин; 3 — фенантрен; 4 — флюорен; 5 — пирен; 6 — 1,3,5 - трифенилбензол; 7 — 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, означающим: 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

разделения 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 популярный 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

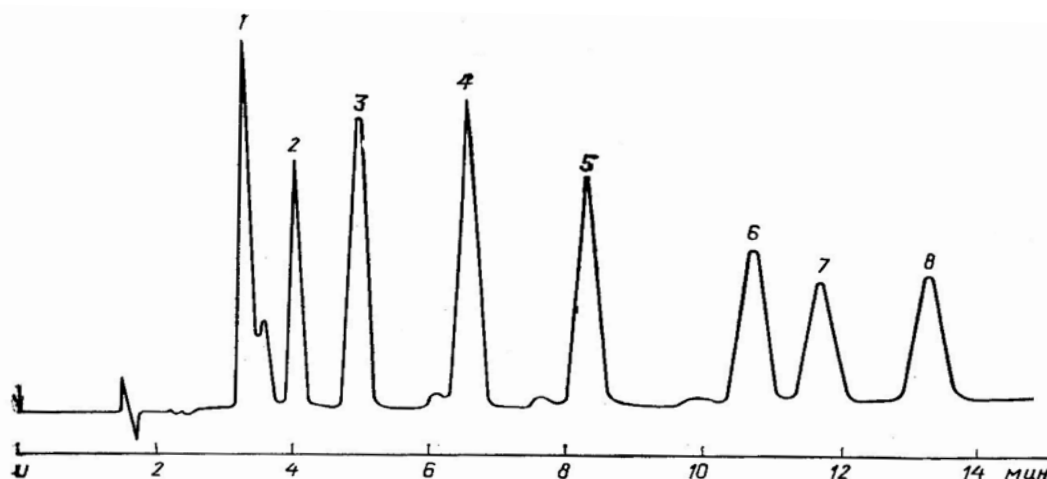


Рис. 2.7. Хроматограмма смеси ароматических углеводородов, полученная на колонке размером 250х4,6 мм с зорбаксом ОДС (6 мкм), подвижная фаза — метанол — вода (90:10 по объему), расход 1,5 мл/мин, детектор УФ (254 нм), проба 20 мкл: 1 — толуол; 2 — о-ксилол; 3 — *трет*-бутилбензол; 4 — *п-трет*-бутилтолуол; 5 — *п-трет*-амил-толуол; 6 — *п-трет*-гексилтолуол; 7 — 3,5-ди-*трет*-бутилтолуол; 8 — *трет*-гексил-о-ксилол

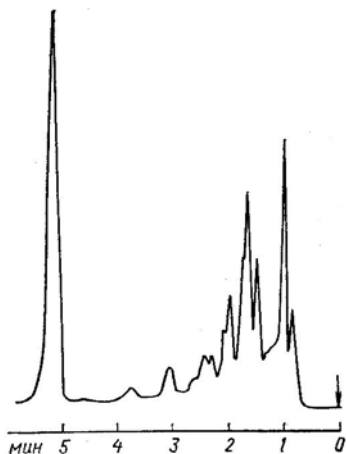


Рис. 2.8. Хроматограмма натурального кофе, полученная на колонке размером 150х4,6 мм с нуклеосилом С8 (5 мкм), подвижная фаза — метанол — 0,01 М фосфатный буферный раствор с pH 7,0 (20:80), расход 1,2 мл/мин, давление 12 МПа, температура 25 °С, детектор Уф (280 нм), проба 20 мкл: 1 — кофеин

приходят в равновесие 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 элюиро-

вание 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 разделе 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. Например, для получения привитой фазы ОДС (октадецилсилан) используют октадецилтрихлорсилан, метилоктадецилдахлорсилан и диметил-октадецилхлорсилан.

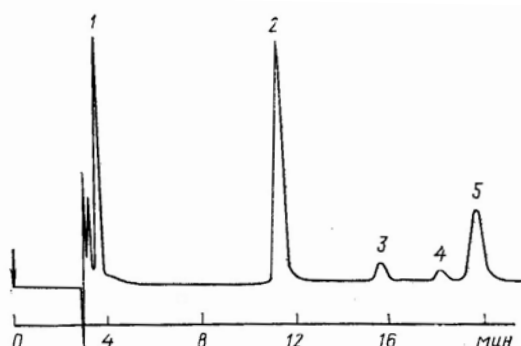
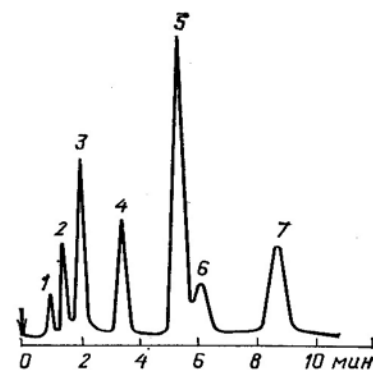


Рис. 2.9. Хроматограмма смеси полибромсодержащих антипиренов, полученная на колонке размером 250x4,6 мм с зорбаксом ОДС, подвижная фаза — метанол, расход 1 мл/мин, детектор—УФ (254 нм), проба 10 мкл: 1 — гексабромбутен-2; 2 — гексабромбензол; 3,4 — примеси; 5 — декабромдифенилоксид

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 — ревонал; 6 — примесь; 7 — тио-генал



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 полимеризации 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 (обыч-

но 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 силаноль-ными 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 накопленный 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 достаточно недороги и удобны, позволяют получить ровно столько очищенной воды, сколько нужно для ближайшей работы. Высокочистая 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 C₁₈. 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} , желательна не обладающая 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 свежееочищенная. Можно использовать стеклянную колонку, заполнив ее более крупным препаративным сорбентом (например, 40 — 63 мкм), и подавать воду под гидро-статическим 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.

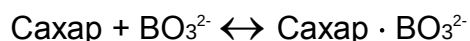
2.3. ИОНООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

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:



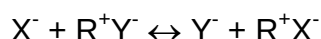
Ионообменная хроматография незаменима при разделении высокополярных веществ, которые без перевода в производные не могут быть проанализированы методом ГЖХ. К таким соединениям относятся аминокислоты, пептиды, сахара.

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

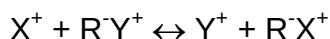
или дни, с помощью ионообменной хроматографии проводят за 20-40 мин с лучшим разделением. Применение ионообменной хроматографии в биологии позволило наблюдать за образцами непосредственно в биосредах, уменьшая возможность перегруппировки или изомеризации, что может привести к неправильной интерпретации 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



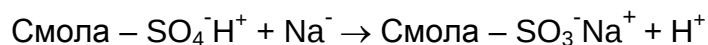
В первом случае ион образца X^- конкурирует с ионом подвижной фазы Y^- за ионные центры R^+ ионообменника, а во втором в конкуренцию с ионами подвижной фазы Y^+ за ионные центры R^- вступают катионы образца X^+ .

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.

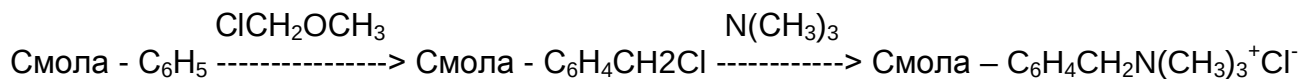
Катиониты получают сульфированием матрицы. Протон, ионно связанный с сульфогруппой, может перемещаться и даже уходить за пределы смолы в раствор. При этом чтобы молекула была в целом электронейтральной, место протона занимает положительно заряженный ион, который из раствора переходит в смолу. Например, 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 триметиламином:



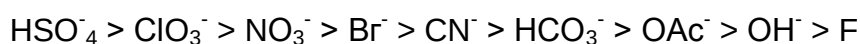
В этих смолах подвижен анион хлора, который может замещаться другим анионом, например OH^- . Катиониты обычно поставляются в H^+ -форме или Na^+ -форме, а аниониты — в OH^- -форме или Cl^- -форме. Таким образом указывается противоион ионо-обменника. Полученные материалы, содержащие сульфатные или триалкиламмонийные 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 — несмешивающиеся 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

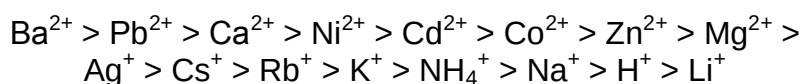


и делят на анионообменном носителе анионы железа. Так как селективность смолы зависит от характера противоиона, часто необходимо изменить форму смолы. Противоионы связаны кулоновскими силами взаимного притяжения с ионообменными группами и экранируют их заряд. Это притяжение зависит от физической природы 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



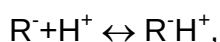
для катионов



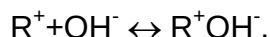
Знать эти ряды полезно для выбора системы элюирования. Наиболее быстрый метод превращения анионита в форму, которая в ряду селективности стоит выше исходной, состоит в промывании ее четырехкратным объемом 1 M раствора соответствующей соли. Если для работы необходима форма слабее исходной, то ее сначала 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 предколонок, 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 числом ммоль эквивалентов обмениваемого 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

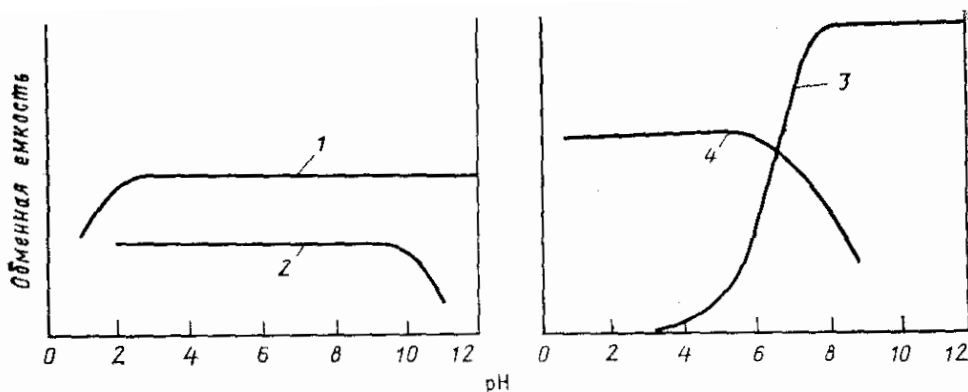


Рис. 2.11. Зависимость емкости ионообменных смол от pH: 1—сильный катионообменник; 2—сильный анионообменник; 3—слабый катионообменник; 4—слабый анионообменник

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 диапа-

зона pH, но и уменьшение прочности сорбции вещества внутри этого диапазона. Слабым ионообменникам, в частности анионитам с замещающими группами диэтиламиноэтила (ДЕАЕ), отдают 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 ионогенных групп. Применение этих материалов значительно увеличивает стабильность работы колонок, в которых не происходит изменения эффективности. Однако сильноокислые или сильноосновные среды ($2 < \text{pH} < 7,5$) могут воздействовать на силикагель, выводя из строя колонку.

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

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 $\text{pH} < 8$ материал не ионизирован, а при $\text{pH} > 8$ 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 $\text{pH} \approx \text{pK}_a + 1,5$, а для оснований $\text{pH} \approx \text{pK}_a + 1,5$. 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 $1/3$ 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 пропусканием 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 OH-форме, где происходит нейтрализация подвижной фазы и удаление электролита из элюента. Анализируемые вещества выходят из колонки 5 в деионизованной 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 Дзержинским 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.

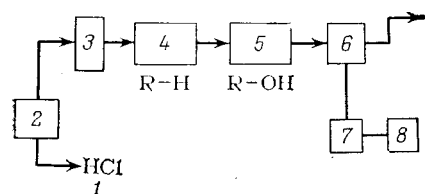


Рис. 2.12. Схема установки для анализа катионов методом ионной хроматографии: 1 — емкость с элюентом; 2 — насос; 3 — ввод пробы; 4 — разделительная колонка; 5 — десорбирующая колонка; 6 — кондуктометрическая кювета; 7 — кондуктометрический детектор; 8 — самописец

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 — силикагель 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 осаждения буферной соли, о чем будет свидетельствовать появление течи в системе и увеличение сопротивления в колонке.

рис. 2.13

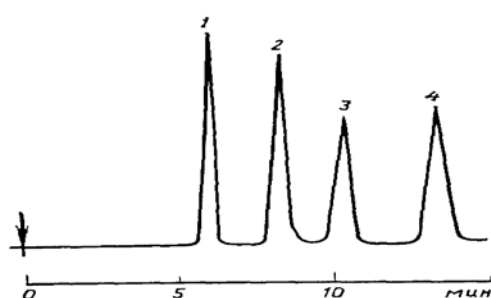


рис. 2.14

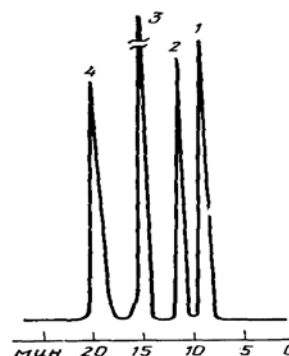


Рис. 2.13. Хроматограмма катехоламинов в плазме и тканях, полученная на колонке размером 250X4,6 мм с нуклеосилом 5SA, подвижная фаза—ацетат-цитратный буферный раствор (pH=5,2), содержащий 10% метанола, детектор—электрохимический (потенциал +0,7 В): 1 — норадреналин; 2 — адреналин; 3—допамин; 4—а-метилдопамин

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. Начинают 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 удовле-

творительно 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_0 — 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:

$$V_t = V_0 + V_i.$$

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 .

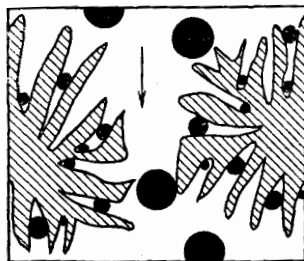


Рис. 2.15. Модель разделения молекул по размеру в эксклюзионной хроматографии

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 полу жестких гелях, видимо, из-за повышенного сродства к матрице геля. Примером может служить адсорбция ароматических соединений на стирол-дивинилбензольных гелях.

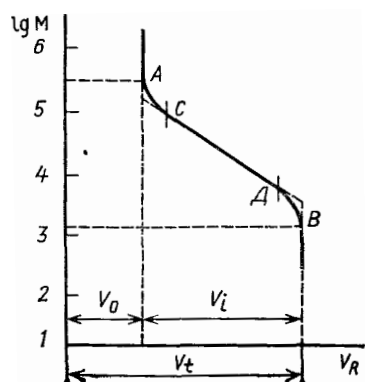


Рис. 2.16. Калибровочная кривая

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 разде-

ления 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 $\pm 10\%$ [23]. Поэтому в данном варианте ВЭЖХ термостатирование раздельной 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 рефрактомет-

ром 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 определения 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 эксклюзионной 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-дивинилбензольными 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 $\oplus$) [см. разд. 4.5.1], области разделения которых перекрываются. При этом, как правило, получали калибровочную зависимость с линейным диапазоном около трех порядков и с достаточно большими криволинейными участками, а продолжительность 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 сорбен-

ты 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.
- 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.

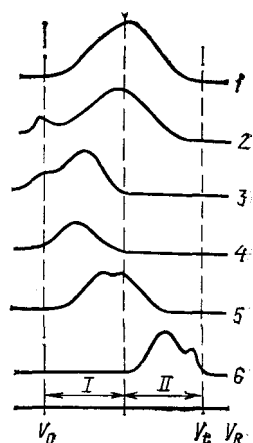


Рис. 2.17. Различные виды хроматограмм неизвестного образца:
1 — область разделения крупнопористой колонки; 2 — область разделения мелкопористой колонки

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 биополимеров, 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, полиэтилентерефталат, 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 $pH < 8,5$; 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 *A*, присоединяют к насосу, устанавливают скорость потока растворителя *A* 0,3-0,5 мл/мин, проводят градиентное изменение состава элюента от 0 до 100% растворителя *B* со скоростью 1%/мин и промывают с той же скоростью растворителем *B* 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 высокоэффективных 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 удастся 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-дивинилбензольными 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 $\text{pH} < 4$ 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 индивидуальные 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 полимеромологов 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:

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

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 ухудшения 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 0,1-0,5мг на 1г сорбента. При работе с наиболее часто применяемыми колонками диаметром 7-8мм и длиной 50-60см масса образца, как правило, не должна превышать 3-5мг.

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 хроматографической системы

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

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

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 $\sigma_{\text{н}}^2 = \sigma_{\text{к}}^2 + \sigma_{\text{в}}^2$ представляет собой дисперсию приборного уширения хроматографической системы. Значение $\sigma_{\text{н}}^2$ 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 системы, 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.

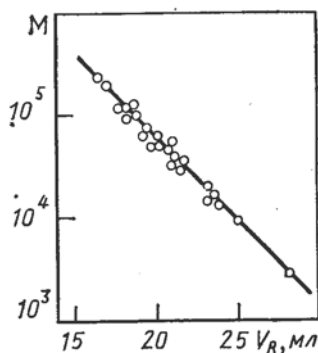


Рис. 2.18. Калибровочная кривая для TSK 3000 SW по индивидуальным белкам

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 на 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:

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

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].

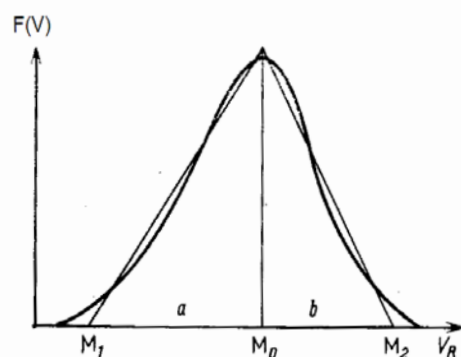


Рис. 2.19. Определение средних молекулярных масс методом «треугольника»

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, $F_i = h_i / \sum h_i$	h_i / M_i	H_i / M_h	Кумулятивная доля фракции, $i=1$ $W' = \sum F_i + (f_i/2)$ $j=1$
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.

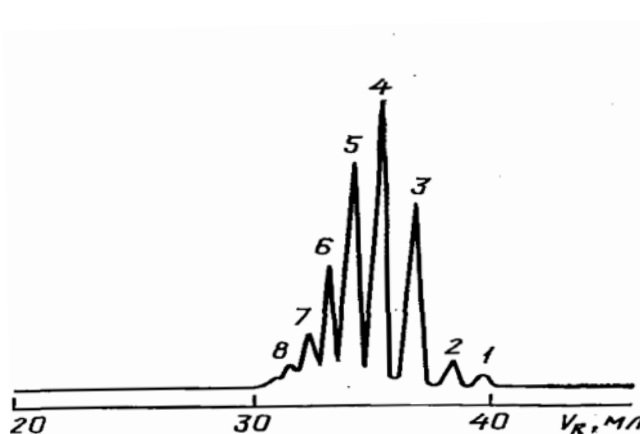


рис. 2.20

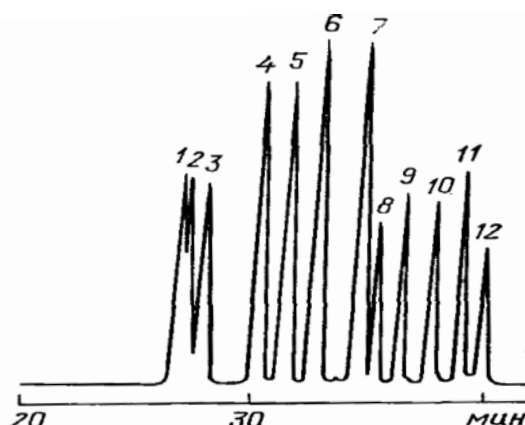


рис. 2.21

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%, алкилбензолов — 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

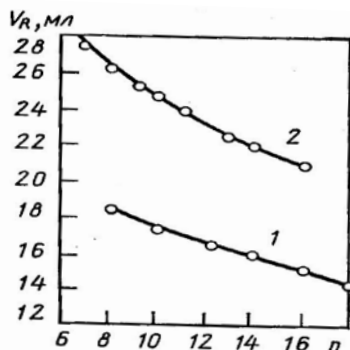


рис. 2.22. Зависимость удерживаемого объема жирных кислот и углеводов на μ -стирогеле от числа атомов углерода в молекуле: 1—жирные кислоты; 2 — углеводороды

На рис. 2.22 приведен график зависимости удерживаемого объема нормальных жирных кислот и парафиновых углеводов от числа атомов углерода в молекуле при использовании тетрагидрофурана в качестве подвижной фазы. Значительная разница в удерживаемых объемах углеводов 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, CCl_4), 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, молярный 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 возрастает 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—30 000.

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 микроколоноки) 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 микроколоноками, 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 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 в 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 микро-фракций 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 флуориметрический детектор с микрокюветой. Широкий набор спектрофотометров с микрокюветами вместимостью 0,5 мкл при 1 мм длины оптического пути выпускает фирма «Кратос»; она же выпускает флуориметрические детекторы с микрокюветами. Изократические хроматографы для микроколоночной ВЭЖХ выпускают фирмы «Шимадзу», «Кнауэр», «ЛКБ», «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 микроколонки и масс-спектрометра, таких, как удаление солей из элюента при использовании буферных систем растворителей, резкое снижение температуры на конце микроколонки 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 микроколонки, 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 принесенных 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 деградации, 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. Невымываемая 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) 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 образца*	Характеристики производных образца			Литература
			λ_1^{**}	λ_2	$\epsilon^{***} \cdot 10^{-4}$	
<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 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- <i>N,N</i> -диметиламинафталин-1-сульфохлорид)	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-диола	-	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 .

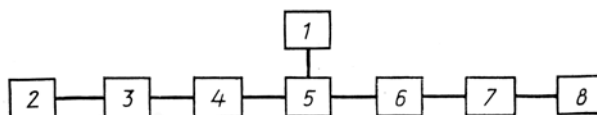


Рис. 3.1. Схема установки для получения производных после колонки: 1—насос, подающий реактив; 2—насос для подачи пробы; 3—колонка; 4—первый детектор (не обязателен); 5 — тройник; 6 — реактор; 7 — второй детектор; 8—спираль, создающая противодавление

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 соединений 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 фосфорганические и карбаматные инсектициды)	Реагент может быть очень чувствительным и специфичным
Субстраты для выбранного фермента	Любой фермент (например лактат-дигидрогеназа, креатинкиназа, щелочная фосфатаза)	Реагент может быть очень чувствительным и специфичным
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 колонки 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 C°
5,5' – Дитио – (2 – нитробензойная кислота)	Тиолы, ферменты, несущие SH-группы	Быстрые реакции, обнаружение по поглощению света на длине волны 412 нм

Этилендиамин-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)
N-Метилникотин-амидхлорид	Соединения с группами –CH ₂ -CO	Продолжительность реакции 2 мин при 100 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

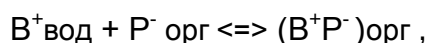
Ион-парная хроматография давно находила применение в жидкостной хроматографии и экстракции для извлечения лекарств и их метаболитов из биологических жидкостей в органическую фазу. Как самостоятельный раздел ВЭЖХ ион-парная хроматография, называвшаяся также экстракционной, парно-ионной, хроматографией 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 невоспроизводимость от партии к партии, меньшая активность и стабильность по сравнению с другими сорбентами и небольшой выбор наполнителя, 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 которой 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 pH, 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 pH=1,5—7,5. Исключение составляет партисип 5 ОДС, работающий при pH=1—8,5. В этом диапазоне pH 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 pH=2—8, удовлетворительно разделяются методом ион-парной хроматографии, когда в подвижную фазу добавляют проти-

воион, 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 B^+P^- 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 pH подвижной фазы изменяется селективность разделения.

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

Неподвижная фаза (вода)*	Подвижная фаза	Противоион	Разделяемые соединения
pH=9,0	Циклогексан (хлороформ), пентанол	N,N-Диметилпро-триптилин**	Карбоновые кислоты
0,1 M HClO ₄	Различные смеси трибутилфосфата, этилацетата, бутанола, CH ₂ Cl ₂ или гексана	ClO ₄ ⁻	Амины
HPO ₄ ²⁻ /буфер PO ₄ ³⁻	Бутанол (CH ₂ Cl ₂), гексан	(C ₄ H ₉) ₄ N ⁺	Карбоновые кислоты
0,1 M HClO ₄	CH ₂ Cl ₂ , CHCl ₃ , бутанол, пентанол	ClO ₄ ⁻	Амины
pH=5-6	CH ₂ Cl ₂ , и (или) CHCl ₃ ,	Пикрат **	Амины
pH=6—8,5	Бутанол, гептан	(C ₄ H ₉) ₄ N ⁺	Сульфонамиды
0,2— 0,25 M HClO ₄	Бутанол (CH ₂ Cl ₂), Гексан	ClO ₄ ⁻	Амины и соли четвертичного аммония
0,1 M метансульфо-кислота	Бутанол (CH ₂ Cl ₂), Гексан	CH ₃ SO ₃ ⁻	Амины
pH=8,3	Бутанол (CH ₂ Cl ₂), Гексан	(C ₄ H ₉) ₄ N ⁺	Карбоновые кислоты
pH=7,4	CH ₂ Cl ₂ (CHCl ₃), бутанол и (или) пентанол	(C ₄ H ₉) ₅ N ⁺ (C ₄ H ₉) ₉ N ⁺ (C ₄ H ₉) ₁₁ N ⁺	Конъюгированные Соединения глюкуронида и сульфатов

* *В 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 углеводов;
- 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 термостатированием 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 желательно 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 тетраэтиламмония 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** Лихросорб – RO-2** μ - Бондапак C ₁₈ **	0,1 М НClO ₄ ацетонитрил pH=7,4 Метанол, pH=2-4	ClO ₄ ⁻ (Бутил) ₄ N ⁺ (Бутил) ₄ N ⁺	Амины Карбоновые кислоты Красители
2. Силикагель – SAS** Силикагель – ODS**	Пропанол или CH ₂ Cl ₂ Метанол, H ₂ SO ₄	Гексадецил (CH ₃) ₃ N ⁺ Додецил SO ₂ ⁻	Сульфокислоты 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 М НClO ₄	Бис(2-этилгексил) фосфат (Октил) ₃ NH ⁺	Фенолы Карбоновые кислоты, сульфонаты

* В воде различными солями или противоионом приданы буферные свойства.

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

Способность различных анионов экстрагировать ион тетра-бутиламмония 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 ацетонитрилом содержание воды, мы увеличиваем силу растворителя и снижаем значение k' для образца. В ион-парной хроматографии в качестве подвижных фаз применяют бутанол, пентанол, метиленхлорид 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 тетрабутиламмония из воды в хлороформ

Противоион	IgE	Противоион	IgE
Cl-	-0,11	Нафталин-2-сульфонат	3,45
Бензоат	0,39	ClO ₄ -	3,48
Br-	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	P'	ϵ	P'+0,25 ϵ
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 ОН- 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 относятся реактив А (0,005 М раствор тетрабутиламмонийфосфата, pH=7,5), реактив В-5 (0,005 М раствор пентансульфоокислоты, pH=3,5) и реактив В-7 (0,005 М раствор гептансульфоокислоты, 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-парной хроматографии с добавкой органической неподвижной фазы является материал, используемый для обращенной фазы, при работе с нормальной фазой приме-

няют 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 рН 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.

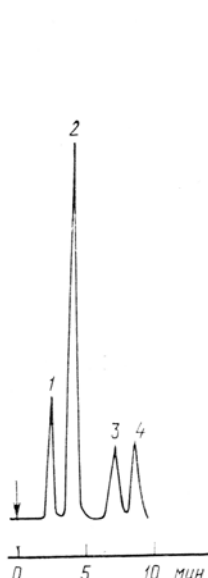


Рис. 3.2.

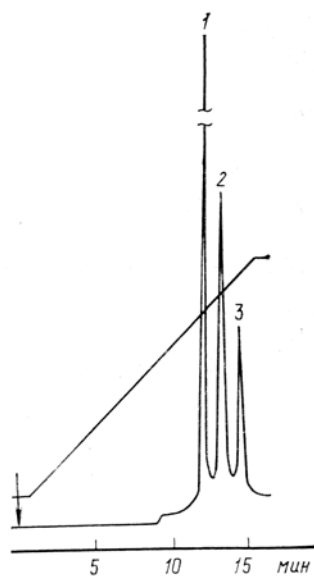


Рис. 3.2. Хроматограмма витаминов, полученная на колонке размером 300 X 4 мм с μ -бондапаком C_{18} , подвижная фаза — метанол — вода (70 : 30) с 0,1% В7 и В5 (1:1), расход 1 мл/мин, детектор — УФ (254 нм): 1 — никотинамид; 2 — пиродоксин; 3 — рибофлавин; 4 — тиамин

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, ко-

гда 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, диами-

ны, 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 лигандообменники с привитыми к силикагелю аминокислотным или полученным из него дитиокарбаматным радикалом.

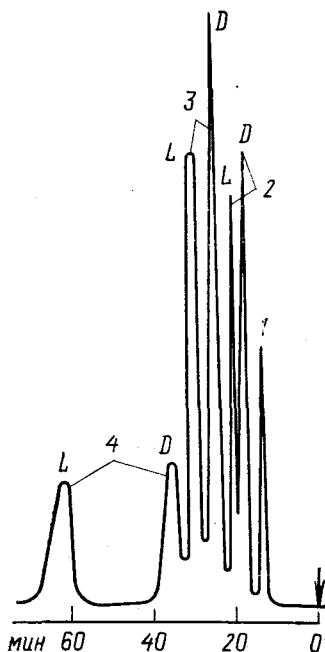


Рис. 3.4. Хроматограмма рацематов аминокислот, полученная на колонке размером 100X1 мм (стекло) с асимметрическим полистирольным анионитом (7,5 мкм), подвижная фаза — 0,25 М ацетат натрия и $1,5 \times 10^{-3}$ М ацетат меди, pH=5,2, детектор—УФ (260 нм): 1 — лизин; 2 — аланин; 3 — серин; 4 — лейцин

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 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 сорбентом.

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, нередко 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 удастся 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 желательно 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 производ-

ных 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.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Цвет 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. Машека, 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.//J. Chromatogr., 1980, v. 196, No. 1, p. 21—37.
10. Cooke N. H. C., Olsen I.//J. Chromatogr. Sci., 1980, v. 18, p. 1—12.
11. Scott C. D., Lee N. E.//J. Chromatogr., 1973, v. 83, p. 383—393.
12. Kabra P. M., Marion L. J. Liquid Chromatography in Clinical Analysis. Humana Press, Clifton, 1981. 466 p.
13. Edelson E. H., e. a.//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.//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. Бельский 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.//J. High Resol. Chromatogr. Commun, 1983, v. 6, No. 11, p. 629—631.
25. Yau W., Grinnard G., Kirkland J.//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.//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.//J. 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.//J. Chromatogr. Sci., 1980, v. 18, No. 9, p. 409—429.
35. Бельский Б. Г., Мальцев В. Г.//В кн.: Прикладная хроматография. М., Наука, 1984, с. 54—64.
36. Энтелис С. Г., Евреинов В. В., Кузавев А. И. Реакционноспособные олигомеры. М., Химия, 1985.
37. Janca J., Kleparnik K.//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.//J. Liquid Chromatogr., 1980, v. 3, No. 7, p. 941—952.
40. Neff B. L., Overton J. R.//J. Liquid Chromatogr., 1984, v. 7, No. 8, p. 1537—1544.
41. Mori S., Suzuki M.//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., Бельский Б. Л./Высокомолекулярные соединения, 1984, т. А26, № 10, с. 2223—2226.
44. Grubisic Z., Rempp R., Benoit J.//J. Polym. Sci., 1967, v. B5, No. 9, p. 753.
45. Рафигов 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. Gaze. 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., Wanald 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. *Артемѣва 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. *Камышиш Л. Г., Ицксон 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.

© www.HPLC.ru Электронная версия книги по ВЭЖХ версия 3 [07 / 2009](#)