

УДК 543.544
ББК Г471
Р 83

Научный редактор д-р хим. наук, проф. *Селеменев В.Ф.*
Рецензент д-р хим. наук, проф. *Котов В.В.*

РУДАКОВ О.Б., ВОСТРОВ И.А., ФЕДОРОВ С.В.,
ФИЛИППОВ А.А., СЕЛЕМЕНЕВ В.Ф., ПРИДАНЦЕВ А.А.

Р 83

СПУТНИК ХРОМАТОГРАФИСТА.

Методы жидкостной хроматографии. – Воронеж,
Изд-во “Водолей”. 2004. – 528 с.
ISBN 5-88563-049-6

В монографии дана характеристика современных методов жидкостной хроматографии, применяемых сорбентов, способов детектирования органических и неорганических веществ. Приведены хроматографические свойства важнейших классов органических веществ, экотоксикантов, компонентов фармакологических препаратов, пищевых добавок. Подробно представлена информация о хроматографических свойствах (физические и технико-эксплуатационные свойства, полярность и элюирующая способность) индивидуальных и бинарных растворителей, применяемых в жидкостной хроматографии. Рассмотрены приемы оптимизации состава подвижных фаз и экспертной оценки качества хроматографических методик анализа с помощью хеометрических методов.

Обширный справочный материал, включенный в книгу, полезен в повседневной работе аналитика-хроматографиста. Книга может служить учебным пособием для аспирантов и студентов старших курсов химических, химико-технологических, биохимических, химико-фармакологических специальностей.

Издание подготовлено при финансовой поддержке ЗАО “НПКФ АКВИЛОН”.

УДК 543.544
ББК Г471

ISBN 5-88563-049-6

© Рудаков О.Б., Востров И.А.,
Федоров С.В., Филиппов А.А.,
Селеменев В.Ф., Приданцев А.А., 2003

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1.	
МЕТОДЫ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ	12
1.1. Общие понятия, терминология	12
1.2. Хроматограмма и хроматографические параметры	13
1.3. Классификация методов жидкостной хроматографии	27
1.4. Варианты жидкостной хроматографии по механизму удерживания веществ	39
1.4.1. Жидкостная адсорбционная хроматография	40
1.4.2. Нормально-фазовая распределительная хроматография	44
1.4.3. Обращенно-фазовая распределительная хроматография	47
1.4.4. Ионообменная хроматография	53
1.4.5. Ионная хроматография	62
1.4.6. Ион-парная хроматография	68
1.4.7. Лигандообменная хроматография	69
1.4.8. Аффинная хроматография	73
1.4.9. Эксклюзионная хроматография	76
1.4.10. Ионоэксклюзионная хроматография	87
1.4.11. Осадочная хроматография	91
1.4.12. Гидродинамическая хроматография	95
1.4.13. Фракционирование в поперечном поле сил	100
1.4.14. Электрофорез	106
1.4.15. Капиллярный электрофорез	110
1.5. Колоночная жидкостная хроматография	113
1.5.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография	115
1.5.2. Микроколоночная высокоэффективная жидкостная хроматография	121
1.5.3. Капиллярная жидкостная хроматография	123
1.6. Планарная жидкостная хроматография	126
1.6.1. Хроматография на бумаге	127
1.6.2. Тонкослойная жидкостная хроматография	129
ГЛАВА 2.	
ХРОМАТОГРАФИЧЕСКАЯ КОЛОНКА, СВОЙСТВА СОРБЕНТОВ	138
2.1. Базовые характеристики хроматографической колонки	138
2.1.1. Геометрия колонок	138
2.1.2. Качество и эффективность колонок	140
2.2. Классификация сорбентов	149
2.3. Сорбенты для адсорбционной и нормально-фазовой хроматографии	151
2.4. Привитые сорбенты для нормально-фазовой хроматографии	153
2.5. Сорбенты для обращенно-фазовой хроматографии	158
2.5.1. Обращенно-фазовые сорбенты для работы на водных подвижных фазах	162
2.6. Сорбенты для ионообменной хроматографии	169
2.7. Сорбенты для эксклюзионной хроматографии	176

2.8. Специальные сорбенты	181
2.9. Диаметр частиц и размеры в мешах	185

ГЛАВА 3.

ПРОФИЛЬ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ТРАКТА	187
3.1. Аппаратура для жидкостной хроматографии	187
3.2. Насосы	188
3.3. Системы ввода пробы	194
3.3.1. Устройства ручного ввода пробы	194
3.3.2. Устройства автоматического ввода пробы	197
3.4. Системы термостатирования	200
3.5. Детекторы	202
3.5.1. Оптические детекторы	204
3.5.2. Рефрактометрические детекторы	209
3.5.3. Флуориметрические детекторы	212
3.5.4. Электрохимические детекторы	215
3.5.5. Другие детекторы	220

ГЛАВА 4.

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СОРБАТОВ	227
4.1. Полярность и гидрофобность сорбатов, как критерии выбора условий разделения	227
4.2. Строение и растворимость сорбатов	234
4.3. Оптические свойства сорбатов и аналитические длины волн	244
4.4. Рефракционные свойства	256
4.5. Флуоресцентные свойства	258
4.6. Электрохимические свойства	265

ГЛАВА 5.

СВОЙСТВА КОМПОНЕНТОВ ПОДВИЖНЫХ ФАЗ	270
5.1. Хроматографические свойства индивидуальных растворителей	272
5.2. Основные физические и эксплуатационные свойства	276
5.3. Прозрачность растворителей в ультрафиолетовом свете	284
5.4. Полярность и элюирующая сила (элюотропные ряды)	288
5.5. Смешиваемость (миксотропный ряд)	306
5.6. Очистка растворителей	315
5.6.1. Углеводороды	319
5.6.2. Галогенпроизводные углеводородов	322
5.6.3. Спирты	325
5.6.4. Простые эфиры	328
5.6.5. Сложные эфиры	330
5.6.6. Кетоны	331
5.6.7. Карбоновые кислоты	332
5.6.8. Азотсодержащие растворители	333
5.6.9. Серосодержащие растворители	335
5.6.10. Вода	335

ГЛАВА 6.

СВОЙСТВА БИНАРНЫХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ	340
6.1. Плотность и объемные свойства	340
6.2. Оптические свойства	346
6.3. Флуоресцентные свойства	355
6.4. Показатель преломления	356
6.5. Вязкость	363
6.6. Диэлектрическая проницаемость	369
6.7. Температура кипения и азеотропные свойства	374
6.8. Способность растворять аналиты	383
6.9. Полярность и элюирующая способность	387
6.9.1. Влияние состава в нормально-фазовой хроматографии	388
6.9.2. Влияние состава в обращенно-фазовой хроматографии	405
6.9.3. Влияние температуры	411
6.9.4. Влияние давления	415
6.9.5. Влияние pH	417

ГЛАВА 7.

ХЕМОМЕТРИЧЕСКИЕ ПРИЕМЫ ОПТИМИЗАЦИИ СОСТАВА ПОДВИЖНОЙ ФАЗЫ	425
7.1. Хемометрика как раздел аналитической химии	425
7.2. Экспертные системы в жидкостной хроматографии	432
7.3. Базы данных в жидкостной хроматографии	435
7.4. Обобщенные критерии подбора оптимальных растворителей	437
7.5. Обобщенные критерии элюирующей силы растворителей	448
7.6. Оценка оптимальности состава бинарной подвижной фазы по обобщенным целевым функциям	459

ГЛАВА 8.

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПЛУАТАЦИИ КОЛОНОК ДЛЯ ВЭЖХ	469
8.1. Подготовка растворителя и пробы	469
8.1.1. Особенности работы с водными растворителями	471
8.1.2. Подготовка раствора пробы	471
8.1.3. Подготовка растворов полимерных образцов	472
8.2. Типичные неисправности, способы их обнаружения и устранения	474
8.3. Методические аспекты обеспечения высокой эффективности колонки	477
8.4. Оптимизация эффективности колонок с малым внутренним диаметром	483
8.5. Проблемы изменения селективности колонок	491
8.6. Проблемы воспроизводимости между параллельными вводами пробы	492
8.7. Регенерация загрязненных колонок	496
8.8. Уход за колонками и их хранение	497

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	502
--------------------------------	------------

ВВЕДЕНИЕ

За многовековую историю развития науки и техники человек открыл и создал не мало подходов к познанию окружающей природы. Всякий раз совершая новые открытия, люди нуждались во все более совершенных инструментах исследований, подтверждающих их догадки. Совершенствовались и методы химического анализа. Шаг за шагом в практику вошло множество “классических” и инструментальных методов. Но среди них, по истине революционным, стало открытие хроматографии, сделанное на рубеже XIX-XX вв. русским ученым М.С.Цветом, вошедшее по оценке ЮНЕСКО в десятку величайших открытий XX века. Многие годы спустя велись бесконечные споры о том, что же такое хроматография. Мы надеемся на то, что помимо стандартных определений хроматографии как науки, процесса и метода, большинство наших читателей согласится с тем, что хроматография – это, во многом, целая философия, ибо в ее основе лежит разделение.

Особое место в списке хроматографических методов занимает жидкостная хроматография как один из самых, если не самый универсальный инструментальный метод анализа, основанный на неразрушающем разделении веществ. Последнее обстоятельство позволяет использовать жидкостную хроматографию не только как аналитический, но и как уникальный технологический метод выделения и очистки веществ, в тех случаях когда другие подходы оказываются неэффективными. Кроме того, не следует забывать, что само открытие и последующее развитие всех хроматографических методов началось именно с жидкостной хроматографии.

Работа над книгой выполнялась в 2003 г., когда научная общественность отмечала 100-летие открытия Цветом М.С. хроматографии. Приведем краткую биографическую справку об основателе этой научной дисциплины.

ЦВЕТ Михаил Семенович (14.5.1872, Асти, Италия, – 26.6.1919, Воронеж), русский ботаник-физиолог, биохимик. Окончил Женевский университет (1893). В 1896 г. получил степень доктора Женевского университета за работу “Исследование физиологии клетки” (опубликована в 1896 г.) и, приехав в Россию, начал изучать хлорофилл в фитофизиологической лаборатории Петербургской АН по предложению

А.С. Фаминцына. С 1897 г. преподавал ботанику на курсах, организованных П. Ф. Лесгафтом при петербургской биологической лаборатории. В 1901 г. в Казанском университете защитил магистерскую диссертацию “Физико-химическое строение хлорофильного зерна”; с 1902 г ассистент кафедры физиологии и анатомии растений Варшавского университета, с 1908 г. преподаватель ботаники Варшавского политехнического института. В 1910 г. в Варшавском университете



защитил докторскую диссертацию “Хромофиллы в растительном и животном мире”. С 1917 профессор Юрьевского (Тартуского) университета, с 1918 г. профессор Воронежского университета. Основные труды посвящены изучению пластид и пигментов растений и разработке методов их исследований. С точки зрения химических наук, особое значение имеет созданный Цветом метод разделения веществ, основанный на избирательном поглощении отдельных компонентов анализируемой смеси различными адсорбентами, изложенный им впервые в докладе “О новой категории адсорбционных явлений и о применении их к биохимическому анализу” (1903 г.), а затем развитый в работах 1906–1910 гг. Этот метод позволил Цвету доказать неоднородность зелёного и жёлтого пигментов листьев растений и получить в чистом виде хлорофиллины α , β и γ (ныне называемые хлорофиллами a , b и c) и ряд изомеров ксантофилла. Открытие Цвета получило широкое применение и признание с начала 30-х гг. прошлого века при разделении и идентификации различных пигментов, витаминов, ферментов, гормонов и других органических и неорганических соединений и послужило основой для создания ряда новых направлений хроматографии. В настоящее время Цвет М.С., наряду с Ломоносовым М. В. и Менделеевым Д.И., является самым известным в мире русским ученым.

Из окон Лаборатории инструментальных методов пищевой химии Воронежской технологической академии, в которой работает

один из авторов этой книги (Рудаков О.Б.), видны церковные купола Алексеево-Акатъевского женского монастыря, на погосте которого, по одной из версий, нашел свое последнее пристанище Михаил Семенович Цвет. По крайней мере, именно там установлена скромная плита с надписью “Ему дано открыть хроматографию – разделяющую молекулы, объединяющую людей”. Авторами эпитафии являются известные хроматографисты Жуховицкий А.А. и Кайзер Р.Е. В 2003 г. был разрушен флигель, в котором прожил последний год жизни М.С. Цвет.

Работая над магистерской диссертацией в Санкт-Петербурге (1900-1902), Цвет не только открыл хроматографический способ разделения и нашел практическое применение для жидкостной хроматографии, но и дал первоначальную трактовку, за счет каких физико-химических явлений это разделение происходит, отметив роль адсорбции и сорбционных равновесий. Тогда же Цвет пришел к выводу, что варьируя состав растворителя, можно целенаправленно управлять хроматографическим процессом. “Хлорофиллины не извлекаются из листьев чистым бензином не потому, что они были бы в нем нерастворимы, а потому, что они удерживаются в хлоропластах молекулярными силами. Точно таким же образом удерживается и хлорофилл, и гипохлорин. Каротин же легко выщелачивается, но достаточно прибавить к бензину одну сотую спирта, чтобы молекулярные силы были преодолены, и все пигменты переходят в раствор, равно, как и гипохлорин... Гипохлорин и пигменты, внедренные в фильтровальную бумагу, полотно или крахмал, относятся к бензину точь в точь, как они это делают в хлоропласте. Внедренные же в песок или в свободном виде, они растворяются в бензине и, следовательно, действие спирта не химическое, а физическое, ... молекулярные силы, удерживающие компоненты хлороглобина (за исключением каротина) в хлоропластах или бумаге должны быть отнесены к категории адсорбционных” [1]. В своих работах Цвет впервые четко показал сложный характер взаимодействий в системе сорбат – сорбент – растворитель. Он подробно изучил не только свойства 126 адсорбентов, но и сорбционные свойства воды, спиртов, ацетона, хлороформа, петролейного эфира, бензола и других растворителей. Им же первым дана классификация хроматографических раствори-

телей по их “электродиссационной силе” (полярности), в качестве критерия полярности растворителя Цвет предложил использовать диэлектрическую проницаемость [2].

Цвет широко использовал хроматографический метод не только для разделения смеси и установления самого факта ее многокомпонентности, но и для количественного анализа, для чего он разбивал стеклянную колонку и разрезал столбик адсорбента на слои. Он предусматривал возможность введения в смеси реперных компонентов (метчиков) для облегчения идентификации и отмечал, что хроматография пригодна и для разделения бесцветных веществ. Цвет использовал хроматографию как препаративный метод для получения отдельных соединений на колонках большого диаметра, он впервые использовал изменение свойств подвижной фазы – градиентное элюирование в ходе хроматографического процесса. Он отметил также необходимость спектрального исследования соединений в адсорбированном состоянии. Цвет разработал аппаратуру для жидкостной хроматографии, впервые осуществил хроматографические процессы при пониженном давлении (откачке) и при некотором избыточном давлении, разработал рекомендации по приготовлению эффективных колонок, впервые использовал как микронасадочные, так и препаративные колонки, обратный поток подвижной фазы в колонке, обратил внимание на необходимость учета одновременного протекания в колонке адсорбционных и диффузионных процессов. Разделение веществ он осуществлял как по методу частичного, так и полного элюирования их из колонки. Тем, кто интересуется судьбой М.С. Цвета, его наследием и оценкой его роли в зарождении хроматографии, рекомендуем литературу [2-11].

После двадцатилетнего забвения жидкостной хроматографии в советской науке, новый прорыв в развитии метода связан с именами Измайлова Н.А. и Шрайбер М.С., создавшим в 1938 году тонкослойную (планарную) хроматографию. Следующее десятилетие – очередной мертвый сезон, и только 50 лет назад, с 1953 года в Академии наук стала официально функционировать Комиссия по хроматографии при Академии наук СССР, которая впоследствии была реорганизована в Научный совет по хроматографии. Существенный вклад в создание и развитие отечественной хроматографичес-

кой школы внесли Беленький Б.Г., Березкин В.Г., Вигдергауз М.С., Витенберг А.Г., Вяхирев Д.А., Гапон Е.Н., Гольберт К.А., Даванков В.А., Жуховицкий А.А., Зенкевич И.Г., Иоффе Б.В., Киселев А.В., Калмановский В.И., Ларионов О.Г., Ольшанова К.М., Рачинский В.В., Ревельский И.А., Сакодынский К.И., Салдадзе К.М., Чмутов К.В., Яшин Я.И. Кроме того, следует отметить немалый вклад в развитие хроматографической науки и приборостроения Научного совета по аналитической химии и персонально Золотова Ю.А. и Шпигуна О.А.

Сегодня жидкостная хроматография как научная дисциплина и как метод разделения и анализа веществ в мировой науке и практике переживает бурный расцвет. Она получила широкое применение в аналитической, неорганической, органической химии, биохимии, микробиологии, медицине, фармацевтике, биотехнологии [11-75]. Прогресс жидкостной хроматографии обусловлен созданием совершенной хроматографической техники: надежных и точных жидкостных насосов, высокоэффективных разделительных колонок и пластин, автоматических прецизионных инжекторов, высокочувствительных детекторов и сканеров, микропроцессорной и компьютерной техники, обслуживающих хроматографическую систему и обрабатывающих результаты анализа. Разработаны различные классы сорбционных материалов, обеспечивающих разделение, основанное на всем разнообразии межмолекулярных взаимодействий. Уверенно в аналитическую практику внедряются гибридные методы, сочетающие в себе жидкостные хроматографы с масс-спектрометрами, ЯМР-спектрометрами, ИК-спектрометрами и атомно-абсорбционными спектрофотометрами. Тонкослойная хроматография, вооруженная современными сканерами и компьютерным программным обеспечением переживает вторую молодость. Новым и наиболее перспективным методом, ворвавшимся в аналитическую практику в последнее десятилетие, стал капиллярный электрофорез, позволяющий легко и с максимальной эффективностью разделять ионогенные вещества самого различного происхождения, перестают быть экзотикой гидродинамическая хроматография и фракционирование в поперечном поле сил.

Если методам газовой хроматографии, в которых подвижной фазой служат разогретые газы, поддаются хроматографированию

только летучие вещества с относительно низкими молекулярными массами, то методам жидкостной хроматографии под силу разделение как неорганических ионов, так и тяжелых органических молекул, полимеров, вирусов, бактерий и частиц с молекулярной массой до 10^7 . В настоящее время разработаны сотни сорбентов с различной селективностью, позволяющие хроматографировать вещества с самым разнообразным строением. В жидкостной хроматографии огромное значение имеет так же природа жидкости, играющей роль подвижной фазы. Благодаря неограниченной возможности варьировать состав подвижной фазы и тип сорбента эффективность методов жидкостной хроматографии в решении аналитических задач чрезвычайно высока. Как говорил К. И. Сакодынский, почти не существует объектов, для разделения которых не удалось бы найти подходящего сорбента и систем растворителей.

К сожалению, несмотря на то, что приоритет открытия хроматографии принадлежит русскому ученому и трудно переоценить огромный вклад наших соотечественников в развитие метода, вследствие ряда объективных причин, развитие практической инструментальной базы жидкостной хроматографии в нашей стране шло относительно медленными темпами. Лишь во второй половине 90-х годов в России интерес к практическому применению ЖХ вновь резко возрос. Это связано с общими социальными и политическими изменениями в мире, возростанием взаимной интеграции мировой экономики и появлением принципиально новых технологий.

Сейчас в нашей стране ощущается острый дефицит специализированной литературы и информации в области практической жидкостной хроматографии на русском языке. Коллектив авторов этой книги надеется, в силу своих возможностей, восполнить данный пробел.

1.1. Общие понятия, терминология

Основные понятия и нормативная терминология, принятые в хроматографии, систематизированы и унифицированы комиссией ИЮПАК (International Union of Pure and Applied Chemistry). В англоязычной версии и в адаптированном к русскому языку варианте современные хроматографические термины изложены в литературе [76,77]. В данной работе мы придерживались рекомендаций ИЮПАК. Хроматографию можно рассматривать как науку, процесс и метод.

Хроматография – наука о межмолекулярных взаимодействиях и переносе молекул или частиц в системе несмешивающихся и движущихся относительно друг друга фаз.

Хроматография – процесс дифференцированного многократного перераспределения веществ или частиц между несмешивающимися и движущимися относительно друг друга фазами, приводящий к обособлению концентрационных зон индивидуальных компонентов исходных смесей этих веществ или частиц.

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

Неподвижная фаза – твердый сорбент или несмешивающаяся с подвижной фазой жидкость, на которых осуществляется дифференцированное удерживание и разделение компонентов смеси.

Подвижная фаза – поток жидкости, перемещающий компоненты разделяемой смеси вдоль неподвижной фазы.

Адсорбент – твердый сорбент, концентрирующий на своей поверхности растворенные вещества.

Абсорбент – твердый или жидкий сорбент, растворяющий в своем объеме газы, пары или компоненты жидких смесей.

Элюент – жидкость, используемая в качестве подвижной фазы.

Элюат – выходящий из колонки поток подвижной фазы с компонентами разделяемой смеси.

Элюирующая сила (способность) подвижной фазы – свойство вступать в такие межмолекулярные взаимодействия с компонентами хро-

матографической системы, которые способствуют десорбции хроматографируемых соединений, более быстрому перемещению концентрационных зон индивидуальных компонентов исходных смесей.

Элюотропный ряд – серия чистых или смешанных растворителей, приведенных в порядке возрастания их элюирующей способности в выбранной хроматографической системе.

Константа распределения вещества, K_c – отношение объемных концентраций вещества (или определенной его формы) в неподвижной и подвижной фазах в условиях равновесия.

Фазовое отношение, β – отношение объемов подвижной фазы и неподвижной фазы в колонке

$$\beta = V_s / V_m \quad (1.1)$$

где V_m – мертвый объем, включающий в себя свободный объем колонки, объем дозатора, детектора, а также объемы коммуникаций между ними; V_s – объем неподвижной фазы в колонке. Фазовое отношение позволяет связать хроматографический процесс с аналогичным ему по составу фаз статическим процессом распределения и в конечном итоге с термодинамическими характеристиками.

Инжектор (дозатор) – составная часть хроматографа, предназначенная для ввода анализируемой пробы.

Колонка – трубка, наполненная сорбентом или полая трубка с нанесенным на внутреннюю поверхность сорбентом, в объеме которого осуществляется хроматографическое разделение смеси веществ.

Детектор – составная часть хроматографа, которая служит для преобразования изменений физических или физико-химических параметров подвижной фазы в электрический сигнал, передаваемый на регистратор хроматограммы.

1.2. Хроматограмма и хроматографические параметры

Хроматограмма – как правило, записанная во времени функция концентрации определяемых веществ в подвижной фазе на выходе из колонки от времени (или объема элюата).

Хроматограмма – наглядное изображение результатов разделения компонентов исходной смеси в планарной хроматографической системе (в тонком слое сорбента, на бумаге и т.д.).

Нулевая (базовая) линия хроматограммы – линия, соответствующая нулевой концентрации анализируемых веществ в элюате.

Шум – помехи, статистические флуктуации нулевой линии хроматограммы. Уровень шума складывается из статистических флуктуаций всех параметров, принимающих участие в образовании сигнала детектора.

Дрейф нулевой линии – постепенное смещение, регистрируемое на хроматограмме.

Хроматографический пик – участок хроматограммы, соответствующий площади ограниченной функцией хроматограммы в момент выхода определяемого вещества из колонки и базовой линией.

Основание пика – продолжение нулевой линии, соединяющее начало и конец хроматографического пика.

Площадь пика, S – площадь хроматограммы, заключенная между пиком и его основанием. В первом приближении

$$S = hW_h \quad (1.2)$$

Высота пика, h – расстояние от максимума пика до его основания, измеренное вдоль оси отклика детектора.

Ширина пика у основания, W_b – отрезок основания пика, отсекаемый двумя касательными, проведенными в точках перегибов восходящей и нисходящей ветвей хроматографического пика.

Ширина пика на полувысоте, W_h – отсекаемый пиком отрезок линии, проведенной параллельно основанию пика на середине его высоты.

Геометрический объем колонки, V_c – внутреннее пространство пустой колонки.

Свободный объем, V_o – часть объема колонки, не занятая сорбентом.

Объем удерживания вещества, V_R – объем подвижной фазы, затрачиваемой на элюирование пробы вещества. Объем удерживания определяют между точкой ввода пробы и точкой, при которой регистрируется максимум сигнала детектора.

Мертвый объем, V_m – объем подвижной фазы между точкой ввода пробы и точкой ее обнаружения (кюветой детектора). Мертвый объем включает в себя свободный объем колонки, объемы устройства ввода пробы (дозатора), детектора, а также объемы коммуникаций между ними.

Приведенный объем удерживания, V_R' – объем удерживания вещества за вычетом мертвого объема:

$$V_R' = V_R - V_m \quad (1.3)$$

Абсолютное время удерживания вещества, t_R – время пребывания исследуемого вещества в хроматографе. Практически время удерживания определяют от момента ввода пробы вещества в хроматограф до момента регистрации максимума соответствующего хроматографического пика.

Мертвое время, t_m – время пребывания несорбируемого вещества в хроматографе. На практике мертвое время определяют от момента ввода пробы несорбируемого вещества в хроматограф до момента регистрации максимума сигнала детектора.

Приведенное время удерживания, t_R' – абсолютное время удерживания за вычетом мертвого времени:

$$t_R' = t_R - t_m \quad (1.4)$$

Хроматографическая колонка – цилиндрический слой неподвижной фазы, взаимодействующий в процессе хроматографического разделения с подвижной фазой и растворенным в ней сорбатом. Молекулы сорбата движутся по колонке, когда они находятся в подвижной фазе, и остаются на месте, когда находятся в неподвижной фазе. Чем больше сродство сорбата 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 подвижной и неподвижной фазам достигается основная цель хроматографии – разделение компонентов на отдельные концентрационные зоны (пики) по мере их продвижения по колонке с подвижной фазой. Хроматографическое разделение возможно только в том случае, если компоненты образца, попадая в колонку при вводе пробы, во-первых, могут быть растворены в подвижной фазе и, во-вторых, будут обратимо взаимодействовать 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, не разделяясь на индивидуальные пики.

Хроматографическая колонка – центральная, принципиально главная часть хроматографической системы. Обычно колонка име-

ет геометрию удлиненного цилиндра с жесткими стенками, изготовленного из металлических, стеклянных или полимерных трубок. Колонка может быть наполнена сорбентом, или представлять собой полую трубку с нанесенным на внутреннюю поверхность сорбентом, в объеме которого осуществляется хроматографическое разделение смеси веществ. Успешная реализация хроматографического процесса зависит не только от параметров сорбента и подвижной фазы, но и от технических характеристик колонки в целом. Колонка должна быть равномерно заполнена максимально однородным слоем сорбента, должны быть сведены к минимуму мертвые объемы в колонке и во всем хроматографическом тракте между инжектором, колонкой и детектором.

Проницаемость колонки B_0

$$B_0 = F\eta L / \pi r^2 \Delta P, \quad (1.5)$$

где ΔP – перепад давления, Па; L – длина колонки, см; r – радиус колонки, см; F – объемная скорость элюента, мл/с; η – вязкость, Па·с.

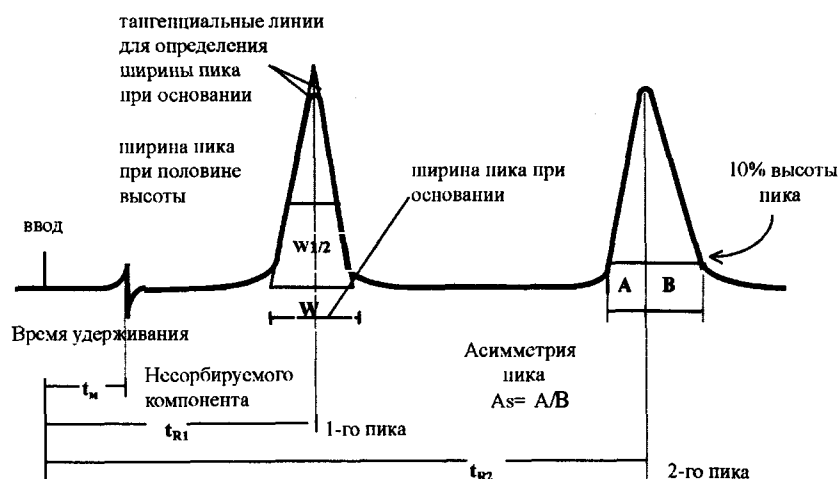


Рис. 1.1. Основные хроматографические параметры: t_M – время удерживания несорбируемого соединения; t_{R1} и t_{R2} – абсолютные времена удерживания компонентов 1 и 2, t_{w1} и t_{w2} – ширина пика у основания, выраженная в единицах времени; A и B – отрезки, образуемые на горизонтальной линии, проведенной на высоте 10% от основания пика при ее пересечении с вертикалью, опущенной из вершины пика

Зависимость проницаемости от диаметра частиц описывается уравнением:

$$B_0 = d^2 / \psi, \quad (1.6)$$

где ψ – фактор сопротивления колонки.

Фактор сопротивления колонки – безразмерная величина

$$\psi = p d^2 t_0 / \eta L^2, \quad (1.7)$$

где p – давление; η – вязкость; L – длина колонки; t_0 – время удерживания несорбируемого вещества. В типичных колонках фактор сопротивления варьирует в пределах 500-2000. Фактор сопротивления для колонок, упакованных микрочастицами одного вида по одному и тому же способу, меняется незначительно, он зависит от способа упаковки и формы частиц. Для частиц неправильной формы он выше, чем для частиц сферической формы.

Эффективность хроматографической системы – количество ступеней установления равновесия между подвижной и неподвижной фазой в выбранных условиях для данного сорбата, способность к образованию узкой концентрационной зоны индивидуального компонента разделяемой смеси. Эффективность в численном выражении определяется значениями числа теоретических тарелок и высотой, эквивалентной теоретической тарелке.

Число теоретических тарелок, N – величина, характеризующая качество колонки и рассчитываемая по параметрам удерживания выбранного вещества по формуле

$$N = 16(t_R/W_b)^2 = 5.545(t_R/W_h)^2 \quad (1.8)$$

где t_R – время удерживания пика, W_h – ширина пика на его полувысоте, W_b – ширина пика у основания.

Высота, эквивалентная теоретической тарелке, H – величина, характеризующая качество колонки и рассчитываемая как отношение длины колонки L к числу теоретических тарелок

$$H = L/N \quad (1.9)$$

Величина H характеризует качество колонки.

Приведенное число теоретических тарелок N' – отношение числа реально полученных теоретических тарелок на колонке данной длины к условной колонке длиной 1 м.

$$N' = 100N/L, \quad (1.10)$$

где L – длина колонки в см.

Приведенная высота, эквивалентная теоретической тарелке

$$H' = H/d, \quad (1.11)$$

где d – средний (эффективный) диаметр частиц сорбента (мкм), она также является характеристикой эффективности колонки. Вполне удовлетворительным принято считать колонки со значением H , равным $3-3,5d$. Очень хорошими считаются колонки с H , равным $2d$.

Фактор удерживания (коэффициент емкости), k' – один из основополагающих параметров удерживания в жидкостной хроматографии, безразмерная величина, характеризующая удерживание вещества и равная отношению абсолютного объема удерживания к свободному объему колонки

$$k' = V_N/V_o, \quad (1.12)$$

а также отношению приведенного времени удерживания к мертвому времени $k' = t_R/t_M$

Селективность (относительное удерживание, $\alpha_{R/cm}$, фактор разделения, α) хроматографической системы – избирательность, способность к специфическим взаимодействиям подвижной и неподвижной фазы с молекулами сорбата, обладающими определенными структурными признаками, приводящая к разной скорости перемещения концентрационных зон индивидуальных компонентов. Количественно селективность выражается как:

- безразмерная величина, равная отношению приведенного объема (времени) удерживания определенного вещества, взятого для сравнения (стандарта) и хроматографируемого в идентичных условиях

$$\alpha_{R/cm} = k_R/k_{cm} = t'_R/t'_{cm} = V'_R/V'_{cm}. \quad (1.13)$$

- величина, которая пропорциональна отношению приведенных времен удерживания двух пиков

$$\alpha = (t_{R2} - t_M)/(t_{R1} - t_M), \quad (1.14)$$

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

- безразмерная величина, характеризующая разделительную способность колонки по отношению к веществам А и Б и численно равная отношению факторов удерживания или приведенных времен (объемов) удерживания,

$$\alpha_{A/B} = k'_A/k'_B = t'_A/t'_B = V'_A/V'_B. \quad (1.15)$$

Селективность колонки зависит от многих факторов, варьируя которые можно подобрать оптимальные условия хроматографии интересующей экспериментатора смеси компонентов. Исходя из химической природы разделяемых компонентов, хроматографист должен выбрать подходящий состав растворителя (подвижную фазу) и соответствующий по химической природе сорбент. Определенное влияние на селективность имеют и такие термодинамические факторы, как температура и давление в колонке, изменяющие коэффициенты распределения веществ между подвижной и неподвижной фазами.

Коэффициент асимметрии A_s – отношение двух отрезков, образуемых на горизонтальной линии, проведенной на высоте 10 % от основания пика, при ее пересечении с вертикалью, опущенной из вершины пика. При этом берется отношение “тыльного” отрезка к “фронтальному” (рис. 1.1).

$$A_s = A/B \quad (1.16)$$

Разрешение пиков, R_s (количество разделения) – расстояние между максимумами выбранных соседних пиков, деленное на полусумму их ширин у основания (выраженных в одних и тех же единицах измерения)

$$R_s = 2(t_{R2} - t_{R1})/(W_{b1} + W_{b2}) \quad (1.17)$$

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.

Экстраколоночное расширение пика (ЭКР) – размывание хроматографической зоны, происходящее в инжекторе, соединительных капиллярах, в ячейке детектора.

Эффективность колонки – характеристика качества колонки, определяемая числом теоретических тарелок и высотой теоретической тарелки. Эффективность колонки тем выше, чем уже ширина пика при том же времени удерживания. Эффективность колонки измеряется числом теоретических тарелок N . Чем выше эффективность, тем больше величина N , тем меньше расширение первоначально узкой концентрационной зоны по мере прохождения ее через колонку, а значит, уже пик на выходе из колонки.

В зависимости от геометрии и назначения (площади поперечного сечения и длины) колонки можно разделить на несколько категорий (табл. 1.1.). Трубка аналитической колонки с обеих сторон закрывается фильтрами (фритами), чтобы сорбент не высыпался из колонки. С детектором и дозатором колонка соединена стандартными капиллярами с внутренним диаметром 0.2-0.3 мм. Фильтры имеют диаметр пор около 2 мкм. Фильтры и капилляры крепятся на колонке штуцерами разной конструкции, в состав фиттингов входят также уплотняющие кольца и конусы. Выпускаются колонки с конструкцией патрона. Функции фильтров в колонке не ограничиваются удерживанием сорбента, они распределяют поток и пробу, попадающие в начало колонки.

Качественное заполнение колонок является одной из самых трудновоспроизводимых процедур, требующее высокую квалификацию оператора, специализированное оборудование, знание “ноу-хау”, поэтому жидкостные хроматографические колонки с хорошими стабильными характеристиками имеют высокую стоимость. Поэтому целесообразно приобретать колонки в фирмах-производителях хроматографических материалов, а не изготавливать их в лабораторных условиях.

К числу основных параметров, определяющих качество колонки и контролирующих высоту, эквивалентную теоретической та-

Таблица 1.1. Геометрические характеристики хроматографических колонок разного назначения и их рабочие параметры

Тип колонки	Длина, мм	Внутренний диаметр, мм	Размер частиц, мкм	Объем вводимой пробы, мкл	Расход элюента, мл/мин
крупномасштабные	≥1500	≥50	30-200	$1 \cdot 10^4 - 2 \cdot 10^6$	100-200
препаративные	300-1500	40-75	6-105	$1 \cdot 10^4 - 1 \cdot 10^6$	20-140
стандартные	100-700	20-50	6-105	$100 - 1 \cdot 10^4$	1-20
полупрепаративные	50-250	1-6	4-20	5-10	0.5-5
стандартные	50-250	0.5-2	3-10	1-5	0.01-0.25
аналитические	50-250	0.5-2	3-10	1-5	0.01-0.25
аналитические микроколонки	50-55000	0.18-0.5	3-5	0.01-1	0.005-0.05
капиллярные колонки	50-55000	0.18-0.5	3-5	0.01-1	0.005-0.05

релке, относятся: объемная скорость, диаметр частиц сорбента (длина диффузионного пути), характер заполнения колонки, геометрия заполнения и коэффициент диффузии. Эти параметры, называемые кинетическими, определяют вид зависимости H от линейной скорости потока u .

Зависимость H от линейной скорости элюента u хорошо описывается известным уравнением Ван-Деемтера [12]. Применительно к ВЭЖХ его записывают следующим образом:

$$H = A + (B/u) + Cu \quad (1.18)$$

Первый член этого уравнения $A = 2\lambda d$, где λ – фактор заполнения, d – средний диаметр частиц. Член A определяет долю размывания полосы, которая не зависит от линейной скорости потока и обусловлена вихревой диффузией. Второй член уравнения (1.18) описывает вклад продольной диффузии в размывание. $B = 2\gamma D_m$, где γ – коэффициент извилистости, учитывающий ограничение пути диффузии в заполненной колонке, D_m – коэффициент диффузии в подвижной фазе. Третье слагаемое $C = \omega d^2/D_m$, где ω – геометрический фактор, характеризует кинетику массопередачи.

Величина A отражает вклад гидродинамических факторов. Чем более однородны частицы сорбента по форме и размерам и чем более равномерно они упакованы, тем меньше A . Еще недавно для A приемлемым значением была величина $A=3$. В настоящее время достижимо $A=1$.

Влиянием B (второго члена уравнения Ван-Деемтера) в жидкостной хроматографии можно пренебречь, если диаметр частиц равен 10 мкм, а линейная скорость превышает 2 мм/с. Однако его влияние на H ощутимо при очень низких скоростях потока, реализуемых в капиллярной ВЭЖХ, в этом случае продольной диффузией нельзя пренебрегать.

Очень важным для ВЭЖХ является коэффициент C , зависящий от скорости массообмена между подвижной и неподвижной фазами. Для пористых сорбентов неподвижная фаза включает и тот объем элюента, который заключен в порах внутри частиц сорбента. Для современных сорбентов $S_{уд} = 200 - 600 \text{ м}^2/\text{г}$, объем пор составляет 0.2-0.9 мл на 1 мл упакованного слоя. Объем элюента между частицами (внешняя пористость) – примерно 0.4 мл. Элюент в

порах практически неподвижен. Это вызвано тем, что поры не сквозные, а диаметр пор в 100 – 200 раз меньше диаметра каналов между частицами. Поэтому даже в сквозных порах скорость движения в 10000 – 40000 раз меньше, чем между частицами, но зато пути диффузии меньше. В силу этого массообмен между подвижной и неподвижной фазами, даже для несорбирующихся веществ происходит за счет истинной диффузии. Для сорбирующихся веществ следует также учитывать массообмен между неподвижным элементом и поверхностью твердого сорбента. Значение C зависит исключительно от внутренних свойств сорбента: размера и формы пор, однородности их по размерам и форме и др. Для хорошего сорбента $C=0.03 – 0.07$. Иначе говоря, при стабильном воспроизводстве методик заполнения решающим фактором в получении высокоэффективных колонок является качество сорбента.

Из вышесказанного можно заключить, что в жидкостной хроматографии можно пользоваться упрощенной формой уравнения Ван Деемтера:

$$H=A+Cu \quad (1.19)$$

Для более полной характеристики качества колонок необходимо определить N в широком диапазоне линейных скоростей под-

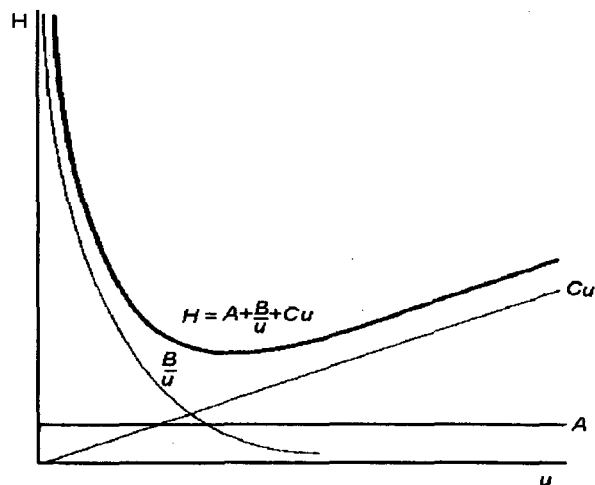


Рис. 1.2. Графическое изображение уравнения Ван-Деемтера и вкладов отдельных его членов в размытие зон

вижной фазы, построить эмпирическую зависимость H от u и рассчитать коэффициенты A и C , используя типовые компьютерные программы.

Таким образом, размытие 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.

Что касается экстраколоночного размытия концентрационной зоны в таких частях хроматографического тракта, как инжектор, ячейка детектора, микрофильтры для улавливания механических частиц из пробы, устанавливаемые после инжектора, предколонки, капилляры, фитинги и др., оно тем больше, чем больше внеколоночный объем по сравнению с удерживаемым объемом пика. В современных хроматографах источники ЭКР тщательно минимизируют. Вместе с тем следует иметь в виду, что при комплектации хроматографа отдельными блоками неправильная комбинация инжекторов, детекторов и соединительных капилляров может привести к ощутимой потере эффективности хроматографической системы в целом [57,78-80].

Давление на входе в колонку пропорционально линейной скорости потока, фактору сопротивления колонки, вязкости растворителя, длине колонки и обратно пропорционально квадрату эффективного диаметра частиц. Соотношение рабочих давлений на входе в колонку, заполненную сорбентом с размером частиц 20, 10, 5 и 3 мкм, при постоянных значениях линейной скорости потока, фактора сопротивления и вязкости растворителя колонки, как показывают расчеты, равно 1: 4: 16:44. Например, для обращенно-фазового сорбента с размером частиц 10 мкм при использовании смеси растворителей метанол – вода (70:30) на стандартной колонке и расходе элюента 1 мл/мин давление на входе в колонку составит 5 МПа, для частиц 5 мкм – 20 МПа, а для 3 мкм – 55 МПа. При использовании силикагеля и менее вязкой системы растворителей – гексан – пропан-2-ол (100:2) значения будут существенно ниже – 1, 4 и 11 МПа, соответственно [57]. Отсюда следует ограничение возможностей применения

мелкодисперсных сорбентов (зернением < 5 мкм) в обращенно-фазовой ВЭЖХ, менее критичное для ее нормально-фазового варианта. Проницаемость колонки лимитирует использование высоких расходов растворителей, позволяющих сократить время анализа.

Для современной скоростной ВЭЖХ характерно использование высоких расходов растворителей, из-за чего требования к возможности насоса стабильно работать при большом рабочем давлении, очень актуально. Большинство изготовителей использует сорбенты с частицами $d=3, 5$ и 10 мкм. Размер частиц 5 мкм наиболее распространенный. При длине 150 мм такие размеры частиц позволяют получать колонки с $N=10\,000$ т. т., на которых продолжительность анализа на 40% меньше по сравнению с колонками длиной 250 мм. При использовании частиц с $d=3$ мкм можно уменьшить длину колонки до $50-100$ мм, сократить продолжительность анализа, однако при этом резко возрастает перепад давления. Сорбенты с частицами $d=10$ мкм используют для решения достаточно простых хроматографических задач, когда необходимо применять вязкие подвижные фазы, либо в случае очень сложных разделений, когда необходимо обеспечить общую эффективность более $50\,000$ т. т. 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 $0,3:0,5:1$, то есть при переходе от 10 к 5 и 3 мкм продолжительность анализа сократится в 2 и $3,3$ раза. Однако это ускорение анализа сопровождается 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.

Важным критерием оценки качества колонки является коэффициент асимметрии A_s . Обычно значения A_s лежат в интервале $0,7-1,5$, для лучших колонок – в пределах $0,9-1,2$. Отклонение A_s от $1,0$

обусловлено многими факторами, в том числе неравномерным распределением пробы по сечению колонки, наличием мертвых объемов, плохим качеством обработки стенки колонки и др. В том случае, когда $A_s \leq (1,2-1,3)$, для расчета эффективности колонки можно пользоваться формулой:

$$N=41,7t_R(A+B)/[(B/A)+1,25] \quad (1.20)$$

где A и B – отрезки, характеризующие симметрию пика (рис. 1.1).

Число теоретических тарелок N , рассчитываемое по параметрам удерживания выбранного вещества, например, компонента 1 , может заметно отличаться от N , рассчитанному по времени удерживания другого компонента:

$$N_1=16(t_{R1}/t_{w1})^2 \neq N_2=16(t_{R2}/t_{w2})^2 \quad (1.21)$$

Вещества для тестирования должны обладать идеальными термодинамическими характеристиками, давая хорошо сформированные симметричные пики. Чтобы выявить реальную эффективность колонки, тест-проба должна содержать вещества, обеспечивающие наименьшее значение N и H . Тестирование нужно вести при нескольких скоростях элюента для нахождения N и H по каждому веществу.

Ряд фирм в качестве параметра использует стабильность колонки, т. е. воспроизводимость N и A_s при проведении повторных анализов, которые, однако, существенно зависят от условий проведения эксперимента. Помимо ухудшения эффективности, проницаемости и симметрии пиков, имеется еще и визуально контролируемый признак нестабильности – усадка слоя сорбента ниже верхнего среза колонки. Основная причина проседания сорбента в колонке и потери эффективности – растворение самого силикагеля, даже привитого. Соответственно предлагаются и разные способы предотвращения нестабильности и проседания, например, особый метод заполнения (“вязкостная консолидация”), который позволяет получать высокоэффективные колонки, не проседающие длительное время и сохраняющие при этом нормальную проницаемость.

Связь между термодинамическими и кинетическими параметрами хроматографического процесса можно выразить через уравнение:

$$R_s = 0,25[(\alpha - 1)/\alpha][k_2/(1 + k_2)]\sqrt{N_2}, \quad (1.22)$$

где k_2 и N_2 – фактор удерживания и число теоретических тарелок, найденные для 2-го компонента из разделяемой пары веществ, с большим временем удерживания.

Разрешение, таким образом, определяется произведением трех сомножителей, первый из которых выражает зависимость от селективности колонки, второй – от фактора удерживания сорбатов и третий – от эффективности колонки. Если $\alpha=1$, то разрешение равно 0, т.е. разделения нет независимо от числа теоретических тарелок в колонке. Однако небольших изменений α достаточно, чтобы привести к заметному увеличению разрешения. Если за счет подбора условий разделения удастся изменить α с 1.1 до 1.2, это приведет к улучшению разрешения в два раза. Следовательно, на фактор селективности следует обращать основное внимание при подборе условий хроматографии, учитывая различие во взаимодействии разделяемых компонентов как в неподвижной, так и в подвижной фазе [57,78]. Следует помнить, что в жидкостной хроматографии подвижная (жидкая) фаза является не инертной средой, как газ в газовой хроматографии, а может играть главную роль в процессе термодинамического распределения разделяемых веществ между неподвижной и подвижной фазами вследствие их селективного взаимодействия с подвижной фазой. Поэтому в выборе условий для высокоселективного разделения как выбор сорбента, так и выбор растворителя имеют одинаково важное значение.

Второй сомножитель в уравнении (1.22) принимает значение, равное 0 (при этом разрешение также равно 0) в том случае, когда коэффициент емкости для второго компонента равен 0, т.е. оба разделяемых компонента элюируются как несорбируемые вещества. Это условие реализуется, когда отсутствует взаимодействие компонентов с неподвижной фазой. С ростом значения k' разрешение увеличивается, скорость хроматографирования при этом падает.

По третьему сомножителю видно, что достигаемое разрешение пропорционально корню квадратному из числа теоретических тарелок, а значит, для увеличения разрешения в 2 раза эффективность колонки нужно увеличить в 4 раза (например, использовать колонку в 4 раза длиннее). Удлинение колонки в 4 раза приводит к увеличению продолжительности анализа также вчетверо, что не всегда приемлемо.

Если эффективность колонки недостаточна, а длительность анализа является важным фактором, эффективность повышают за счет

применения колонки с сорбентом, который имеет меньшие размеры частиц. В этом случае платой за большую эффективность при той же скорости анализа является повышение давления на колонке.

Для хроматографистов наиболее очевидными характеристиками приобретаемой хроматографической колонки являются значения приведенного числа теоретических тарелок N' и величина H' – отношение достигаемой высоты, эквивалентной теоретической тарелки к среднему диаметру частицы сорбента. Что касается формы частиц, то в случае частиц сорбента нерегулярной формы достижимы эффективности не меньшие, чем в случае частиц сферической формы. Это объясняется тем, что частицы нерегулярной формы могут быть упакованы более плотно, чем сферические. Однако при прочих равных условиях колонки, заполненные сферическими частицами, имеют лучшую проницаемость.

1.3. Классификация методов жидкостной хроматографии

В общем случае к жидкостной хроматографии относят все хроматографические методы, в которых подвижной фазой является жидкость. Можно выделить 8 систематизирующих признаков для группировки хроматографических методов: 1) по агрегатному состоянию хроматографической системы; 2) по способу перемещения сорбата; 3) по конфигурации разделяющей системы; 4) по относительной полярности подвижной и неподвижной фаз; 5) по механизму разделения веществ; 6) по цели и задачам; 7) по химическому превращению сорбата; 8) по способу детектирования. В отдельную группу выделяют электрофорез и электрохроматографические методы [76].

По агрегатному состоянию фаз хроматографической системы методы жидкостной хроматографии классифицируют на жидкостно-адсорбционную, жидкостно-жидкостную и противоточную жидкостную хроматографию. *По способу перемещения сорбата* различают следующие виды жидкостной хроматографии: вытеснительная, фронтальная, элюэнтная, изократическая, градиентная, с программированием температуры, давления и скорости потока элюэнта. *По конфигурации разделяющей системы* выделяют планар-

ную (бумажную, тонкослойную), колоночную, микроколоночную, многоколоночную, циркуляционную, многомерную, перколяционную хроматографию и мультихроматографию. По относительной полярности подвижной и неподвижной фаз различают нормально- и обращенно-фазовую жидкостную хроматографию. Важнейшим классификационным признаком служит механизм разделения веществ. По механизму разделения выделяют адсорбционную, распределительную, эксклюзионную, афинную, лигандообменную, ионообменную и другие виды жидкостной хроматографии. По цели и задачам можно выделить аналитическую, препаративную и обращенную ситовую хроматографию. По химическому превращению сорбата выделяют реакционную и осадочную хроматографию. По способу детектирования различают хроматографические методы, сочетающие разделение компонентов смеси с прямым детектированием веществ оптическими детекторами, работающими в ультрафиолетовой, видимой, инфракрасной области, рефрактометрическими, эмиссионными, флуориметрическими, хемилюминесцентными, электрохимическими и другими детекторами. Ниже даны определения для важнейших методов ЖХ [76]. Отметим, что к приведенной классификации и некоторым определениям высказываются претензии, однако, по нашему мнению, дискуссии носят не принципиальный характер.

Аналитическая хроматография – хроматография, используемая для качественного анализа смеси и (или) количественного определения отдельных компонентов смеси.

Адсорбционная хроматография – хроматография, в которой неподвижной фазой служит твердый адсорбент и разделение смеси веществ происходит в результате различия в константах адсорбции веществ.

Афинная (биоспецифическая) хроматография – жидкостная хроматография, в которой разделение смеси биологически активных веществ происходит за счет различия в их биоспецифическом взаимодействии с комплементарными сорбционными центрами неподвижной фазы. Методом афинной хроматографии разделяют полипептиды, белки и другие макромолекулы биологически активных веществ. По сути, это вариант лигандообменной хроматографии, применение которого не-

обходимо, если важно сохранить активность, повысить выход и степень очистки препаративно выделяемого компонента. Взаимодействие вещества и лиганда должно быть обратимым. Лиганд при помощи реакционноспособных групп осуществляет связь с матрицей, сохраняя при этом биоспецифическую активность. Активные центры многих биологически активных веществ часто локализованы в середине глобулы и недоступны для небольших структур лигандов, непосредственно связанных с матрицей, поэтому между матрицей и лигандом часто встраивают дополнительный блок – спейсер (“ножку”).

Бумажная хроматография – планарная хроматография, в которой в качестве сорбента используют специальную бумагу. Бумажная хроматография, открытая в 1944 г., до сих пор используется в малобюджетных лабораториях на предприятиях пищевой промышленности и в образовательных учреждениях, поскольку является самым простым и дешевым хроматографическим методом. Она может сочетаться с электрофорезом, дополнять метод ТСХ, а в отдельных случаях конкурировать с ним [78]. Бумажную хроматографию можно разбить на распределительную, адсорбционную и ионообменную. В качестве твердого носителя неподвижной фазы применяют целлюлозную фильтровальную бумагу особой чистоты с некоторыми специальными свойствами.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) – колоночная или планарная хроматография, в которой применяют сорбенты с размером частиц 3 – 10 мкм, в результате чего резко возрастает эффективность хроматографического разделения.

Вытеснительная хроматография – хроматографический метод, в котором смесь веществ периодически вводится в поток жидкой подвижной фазы и вытесняется затем из колонки с помощью вещества (вытеснителя), десорбирующего все слабее удерживаемые компоненты смеси, причем в итоге смесь разделяется на примыкающие друг к другу зоны индивидуальных компонентов, выходящих в порядке увеличения их сорбируемости.

Гель-проникающая хроматография – эксклюзионная хроматография, в которой неподвижной фазой служит гель.

Гель-электрофорез – электрофорез, в котором смесь заряженных макромолекул разделяется в результате различия в их заряде, раз-

мере и скорости миграции через гель (или раствор нейтрального полимера), помещенный в электрическое поле.

Гидродинамическая хроматография – жидкостная хроматография, в которой роль неподвижной фазы играют стенки колонки (канала) и разделение смеси макромолекул или частиц происходит вследствие различия скоростей протекания подвижной фазы вдоль оси канала и у его стенок, а также за счет распределения разделяемых частиц по сечению канала в соответствии с их размером. Колонка заполняется твердыми непористыми сферическими частицами из стекла, пластика или ионообменной смолы размером от 10 до 50 мкм в зависимости от эффективности колонки. Вместо колонки может применяться полый капилляр. В последнем случае говорят о капиллярном варианте гидродинамической хроматографии.

Гидрофильная хроматография – жидкостная хроматография на полярных сорбентах, в которой в качестве подвижной фазы используются водно-органические растворы и разделение смеси веществ происходит в результате различия в их взаимодействии с полярными группами сорбента в условиях убывающего градиента органического модификатора в элюенте.

Гидрофобная хроматография – жидкостная хроматография на неполярных сорбентах, в которой в качестве подвижной фазы используются водные или водно-органические буферные растворы и разделение смеси веществ происходит в результате различия в их взаимодействии с гидрофобными группами сорбента в условиях убывающего градиента солей в элюенте.

Градиентная жидкостная хроматография – элюентная хроматография, при которой состав смешанной подвижной фазы в процессе разделения компонентов изменяют по заданному закону.

Жидкостно-адсорбционная (жидкостно-твердофазная) хроматография (ЖАХ) – хроматографический метод, в котором подвижной фазой служит жидкость, а неподвижной – твердый адсорбент.

В этом методе в качестве неподвижных фаз наиболее широкое распространение получили оксид алюминия и силикагель. Реже применяют синтетический силикат магния (флоризил), оксид магния, пористые стекла, пористые полимеры и неполярный адсорбент – активированный уголь. С появлением ВЭЖХ силикагель

стал основной полярной неподвижной фазой. Таким образом, ЖАХ на силикагеле – нормально-фазовая хроматография, в которой неподвижная фаза более полярна, чем подвижная. Для формирования подвижных фаз в этом варианте хроматографии в качестве растворителей применяют неполярные алифатические углеводороды или дихлорметан, а в качестве модифицирующих добавок – спирты, простые ациклические и циклические эфиры, сложные эфиры, галогеналканы.

Жидкостно-жидкостная хроматография (ЖЖХ) – хроматографический метод, в котором подвижной и неподвижной фазами служат несмешивающиеся друг с другом жидкости, причем неподвижная фаза нанесена на твердый носитель или на внутреннюю поверхность колонки. Получение неподвижных жидких фаз на пористых носителях возможно, как и в ГЖХ, нанесением их на сорбент. В данном случае для поддержания эффективности и селективности разделения подвижную фазу необходимо насыщать нанесенной на носитель неподвижной фазой.

Изократическая жидкостная хроматография – элюентная хроматография, при которой состав подвижной фазы сохраняется постоянным на протяжении всего процесса разделения компонентов.

Ионная хроматография – высокоэффективная ионообменная хроматография, в которой применяется кондуктометрическое детектирование разделенных ионов. Существует два варианта ионной хроматографии. При *одноколоночном* варианте элюат с аналитической колонки поступает непосредственно в кондуктометрический детектор. При этом детектирование осуществляется на фоне относительно высокой фоновой электропроводности элюента. В случае использования двух-колоночного варианта, элюат с аналитической колонки подается в систему подавления фоновой электропроводности и лишь за тем в детектор. В общем случае второй вариант имеет более чем на порядок высокую чувствительность определения, обладая при этом рядом других недостатков (увеличением экстраколоночных эффектов, требованиями дополнительного аппаратного оформления и т.д.). Выбор того или иного варианта осуществляется в соответствии с задачей и в первую очередь зависит от подвижности анализируемых ионов.

Ионообменная хроматография – жидкостная хроматография, в которой неподвижной фазой служит катионит или анионит и разделение смеси ионизированных веществ происходит в результате различия в их константах ионного обмена, т.е. 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 с фиксированными зарядами, 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. *Амфотерные (биполярные) иониты* содержат в своей матрице и катионные и анионные обмениваемые группы.

Ион-парная хроматография – жидкостная хроматография, в которой подвижная фаза содержит сорбируемое ионогенное вещество (ион-парный реагент) и разделение смеси веществ происходит за счет различия в способности веществ к образованию ионных пар и (или) в коэффициентах распределения ионных пар между подвижной и неподвижной фазами. Суть метода заключается в динамическом модифицировании обращенно-фазового сорбента группами, обладающими ионообменными свойствами.

Ионоэксклюзионная хроматография – эксклюзионная хроматография, в которой разделение основано на электростатическом отталкивании, полярных и гидрофобных взаимодействиях между растворённым соединением и сорбентом.

Капиллярная жидкостная хроматография – колоночная хроматография, в которой используют капилляры с внутренним диаметром ≤ 0.5 мм.

Колоночная хроматография – способ хроматографии, в котором процессы разделения смеси веществ осуществляются в колонке.

Критическая хроматография – жидкостная хроматография олигомеров или полимеров в таких условиях (состав смешанного элюента,

температура, природа и пористая структура сорбента), когда адсорбционные взаимодействия с сорбентом компенсированы эксклюзионными эффектами, так что удерживание макромолекул определяется не их размером, а наличием специфических (концевых) функциональных групп или топологией молекулы (циклы, разветвления).

Лигандообменная хроматография – хроматография, в которой неподвижная и (или) подвижная фаза содержат комплексообразующий ион металла и разделение смеси веществ происходит за счет различия в константах комплексообразования веществ и (или) коэффициентах распределения комплексов между подвижной и неподвижной фазами. В этом методе под *лигандом* понимают нейтральную молекулу или анион, связанный с ионом металла координационной связью. Путем обобществления неподеленной электронной пары донорного атома лиганда центральный катион металла достраивает свою электронную оболочку до структуры, аналогичной электронной оболочке атома инертного газа. Если связь лиганд – металл лабильна, один лиганд может замещать другой. Возможны ионообменный, ион-парный и обращенно-фазовый варианты – лигандообменной хроматографии.

Многомерная хроматография – способ хроматографии, при котором смесь веществ разделяется вначале в одних условиях, а затем отдельные фракции элюата подвергаются дальнейшему разделению в других условиях или иных хроматографических системах.

Микроколоночная хроматография – жидкостная колоночная хроматография, в которой используются колонки с внутренним диаметром ≤ 2 мм.

Мицеллярная хроматография – жидкостная хроматография, в которой в качестве подвижной фазы служит раствор поверхностно-активного вещества с концентрацией выше критической концентрации мицеллообразования.

Многоколоночная хроматография – способ хроматографии, при котором разделяемая смесь веществ пропускается через две или более последовательно соединенные колонки с неподвижными фазами различной химической природы.

Мультихроматография – неоднократно повторяемая хроматография в системе из двух колонок с неподвижными фазами одинако-

вой или различной химической природы, при которой селективность системы варьируют путем изменения по заданному закону физических условий разделения (градиент давления или расхода подвижной фазы, градиент температуры) в одной или двух колонках.

Нормально-фазовая хроматография (НФХ) – жидкостная хроматография, в которой неподвижная фаза более полярна, чем подвижная. Наряду с ЖАХ на силикагеле и оксиде алюминия к НФХ можно отнести распределительный вариант ВЭЖХ, в котором разделение смеси на компоненты осуществляется за счет различия их коэффициентов распределения между двумя несмешивающимися фазами – растворителем (подвижной фазой) и фазой на сорбенте (неподвижной фазой).

Обращенная ионообменная хроматография – эксклюзионная хроматография, используемая для исследования пористой структуры сорбента.

Обращенно-фазовая хроматография (ОФХ) – жидкостная хроматография, в которой неподвижная фаза менее полярна, чем подвижная. Это вариант распределительной хроматографии, в котором используют сорбенты с привитыми неполярными (как правило, длинными алкильными или алкилсилильными) группами и полярный растворитель (например, водно-метанольные, водно-ацетонитрильные смеси).

Осадочная хроматография – реакционная планарная хроматография, при которой разделяемые соединения образуют с компонентами элюента труднорастворимые осадки, располагающиеся на поверхности сорбента в порядке увеличения их произведений растворимости.

Перколяционная (перфузионная) хроматография – хроматография, при которой поток подвижной фазы осуществляется через поры твердого сорбента, а не между частицами сорбента.

Планарная хроматография – способ хроматографии, в котором процессы разделения смеси веществ осуществляются в плоском слое сорбента.

Препаративная хроматография – хроматография, используемая для выделения чистых компонентов (с целью их очистки) или фракций из смеси.

Противоточная жидкостная хроматография – жидкостно-жидкостная хроматография, основанная на распределении веществ

между двумя движущимися относительно друг друга несмешивающимися жидкостями. Разновидностью противоточной хроматографии является *пенная хроматография*, в которой в противоположных направлениях перемещаются раствор поверхностно-активного вещества и пена, образуемая им и потоком газа.

Радиохроматография – хроматографический метод, сочетающий разделение компонентов смеси с детектированием веществ по их радиоактивности.

Распределительная хроматография – хроматография, в которой неподвижной фазой служит жидкий или твердый абсорбент и разделение смеси веществ происходит в результате различия в коэффициентах распределения веществ между подвижной и неподвижной фазами.

Реакционная хроматография – хроматографический метод, при котором разделяемые соединения подвергаются в хроматографической системе химическим превращениям, включая перевод в производные до или после хроматографической колонки.

Сверхкритическая флюидная хроматография – хроматографический метод, родственный жидкостной хроматографии, в которой подвижной фазой является вещество, находящееся в сверхкритическом или субкритическом состоянии (флюид).

Тонкослойная хроматография (ТСХ) – планарная хроматография, в которой процессы разделения смеси веществ осуществляются в тонких слоях сорбента, нанесенного на инертную твердую подложку или в пленках пористого полимерного материала. В методе ТСХ, как и в колоночной ЖХ, могут быть реализованы нормально-фазовый, обращенно-фазовый, мицеллярный и хиральный варианты хроматографирования. Наиболее распространен вариант НФХ.

Хроматография с косвенным (непрямым) детектированием – хроматографический метод с использованием элюента, дающего постоянный отклик детектора, который ослабевает при прохождении через детектор разделенных веществ, не дающих такого отклика [78].

Хроматография с программированием температуры – элюентная хроматография, при которой температуру колонки в процессе разделения компонентов изменяют по заданному закону.

Хроматография с программированием давления – элюентная хроматография, при которой давление подвижной фазы в процессе разделения компонентов изменяют по заданному закону.

Хроматография с программированием расхода – элюентная хроматография, при которой расход подвижной фазы в процессе разделения компонентов изменяют по заданному закону.

Хромато-масс-спектрометрия – хроматографический метод, сочетающий разделение компонентов смеси с масс-спектрометрическим детектированием разделенных веществ.

Циркуляционная хроматография – способ хроматографии, при котором разделяемая смесь веществ циркулирует с потоком подвижной фазы через одну и ту же хроматографическую колонку или систему колонок.

Фракционирование в поперечном поле сил (Fild-Flow Fractionation) – жидкостная хроматография, в которой роль неподвижной фазы играют стенки колонки (канала) и разделение смеси макромолекул или частиц происходит вследствие различия скоростей протекания подвижной фазы вдоль оси канала и у его стенок, а также за счет распределения разделяемых частиц по сечению канала в соответствии с их размерами и поведением в приложенном в поперечном направлении поле (гравитационном, магнитном, температурном). Фракционирование в потоке под действием силовых полей методологически можно рассматривать как однофазовую жидкостную хроматографию. Силовое внешнее поле, или градиент в одной фазе, заменяет собой силы разделения и адсорбции и распределяет растворенное вещество между различными областями потока.

Фронтальная хроматография – хроматографический метод, в котором смесь веществ непрерывно вводится с жидкой подвижной фазой и разделяется в колонке на примыкающие друг к другу зоны с последовательно увеличивающимся числом компонентов, выходящих в порядке увеличения их сорбируемости.

Элюентная (элютивная, проявительная) хроматография – хроматографический метод, в котором смесь веществ периодически вводится в поток жидкой подвижной фазы и разделяется в колонке на зоны компонентов, выходящих отдельно друг от друга в порядке увеличения их сорбируемости.

Энантиоселективная (хиральная) хроматография – хроматография, в которой разделение энантиомеров происходит за счет энантиоселективности их взаимодействия с хиральными компонентами (хиральными селекторами) неподвижной и (или) подвижной фазы.

Электрохроматография – жидкостная хроматография, в которой в качестве побудителя движения подвижной фазы используется электрическое поле, вызывающее электроосмотическое перемещение жидкой фазы вдоль поверхности твердой фазы.

Электрохимическая хроматография – жидкостная хроматография, в которой взаимодействие компонентов разделяемой смеси с электропроводящим сорбентом регулируется приложенным к нему потенциалом.

Электрофорез – метод разделения смеси диссоциирующих веществ, основанный на различии в электрофоретической подвижности их ионов в растворе электролита, помещенного в электрическое поле. *Изотахорофез* – электрофорез, в котором перед разделяемой смесью помещают лидирующий электролит, а после нее – концевой электролит, причем под воздействием электрического поля смесь разделяется на примыкающие друг к другу зоны индивидуальных компонентов, выходящих в порядке понижения их электрофоретической подвижности. *Капиллярный электрофорез* – метод разделения смеси заряженных или нейтральных молекул, основанный на различии в их электрофоретической подвижности и (или) распределении между раствором и движущимися в электрическом поле заряженными частицами (мицеллами, коллоидными частицами, металлокомплексами, молекулами полиэлектролита). *Изоэлектрофокусирование* – метод разделения в электрическом поле смеси амфотерных соединений, основанный на их распределении вдоль колонки с градиентом pH в соответствии с их изоэлектрическими точками.

Эксклюзионная (ситовая) хроматография – жидкостная хроматография, в которой неподвижной фазой служит пористое тело или гель и разделение смеси веществ происходит в результате различия в размерах молекул веществ и (или) их форме и способности проникать в поры неподвижной фазы.

Таким образом, во всех методах жидкостной хроматографии жидкая подвижная фаза самым активным образом влияет на удерж-

Области применения основных вариантов жидкостной хроматографии в зависимости от молекулярной массы схематично приведены на рис. 1.4. Очевидно, что сфера приложения жидкостной хроматографии составляет львиную долю всех известных химических веществ и микробиологических субстанций. Если методы газовой хроматографии ограничиваются молекулярными массами веществ, которые при повышенной температуре можно перевести в паровую фазу и подать через испаритель в колонку, то для решения конкретной хроматографической задачи методами жидкостной хроматографии необходимо лишь тщательно подобрать состав

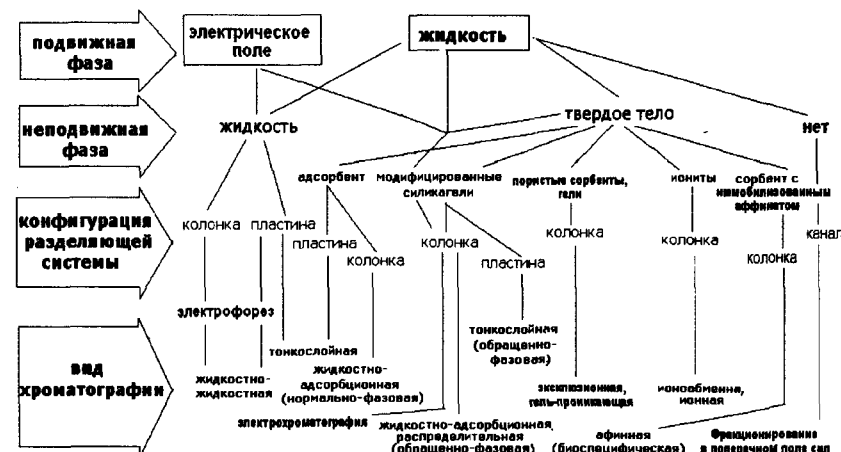


Рис.1.3. Классификация основных вариантов жидкостной хроматографии по основному признаку – наличию жидкой подвижной фазы



Рис.1.4. Области применения различных вариантов хроматографического метода

подвижной фазы, соответствующий физическим и химическим свойствам сорбата, сорбента, возможностям детектирующего устройства и технико-эксплуатационным свойствам периферии хроматографической системы.

1.4. Варианты жидкостной хроматографии по механизму удерживания веществ

К дифференциации по механизмам сорбции разделяемых веществ следует относиться с пониманием ее схематичности. Она дает общую картину процесса разделения. Вместе с тем следует помнить, что удерживание компонентов различного строения в одной и той же хроматографической системе может быть обусловлено несколькими механизмами, конкурирующими между собой. Неоднородность поверхности сорбента, возможная даже у химически привитых фаз, оказывает существенное влияние на удерживание.

Например, в ОФХ оставшиеся не модифицированными силанольные группы силикагеля вызывают разделение и по адсорбционному, и по ионообменному, и по ион-эксклюзионному механиз-

мам. Изменение состава элюента в различной степени влияет на разные механизмы удерживания, поэтому для получения прогнозируемых и воспроизводимых хроматографических результатов необходимы данные об этих механизмах, их относительной роли, а также о влиянии на них состава подвижной фазы. Нередко замена одного растворителя другим может изменить коэффициент емкости в 1000-10000 раз.

1.4.1. Жидкостная адсорбционная хроматография

В колоночной жидкостной хроматографии в качестве неподвижных фаз широкое распространение получили оксид алюминия и силикагель. Реже применяют синтетический силикат магния (флоризил), оксид магния, пористые стекла, пористые полимеры и неполярный адсорбент – активированный уголь. С появлением ВЭЖХ силикагель стал основной полярной неподвижной фазой. Таким образом, ЖАХ на силикагеле – нормально-фазовая хроматография, в которой неподвижная фаза более полярна, чем подвижная. Для формирования ПФ в этом варианте хроматографии в качестве растворителей применяют неполярные алифатические углеводороды или дихлорметан, а в качестве модифицирующих добавок – спирты, простые ациклические и циклические эфиры, сложные эфиры, галогеналканы.

Главные преимущества силикагеля – относительная инертность, большая адсорбционная емкость, он легко поддается модификации: различные его типы значительно отличаются по размерам пор и суммарной удельной поверхности, измеренным в стандартных условиях. Поверхность силикагеля также можно модифицировать или покрыть пропитывающей средой.

В настоящее время известно более ста сортов (различных модификаций) силикагеля, а также ряд силикагелей с химически модифицированной поверхностью, однако выбор элюента в ЖАХ играет более значимую роль, чем выбор неподвижной фазы. Меняя природу ПФ, можно в широких пределах изменять объемы удерживания и селективность разделения на одних и тех же адсорбентах.

Силикагель $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ имеет аморфную структуру, его внутренняя поверхность энергетически неоднородна из-за наличия несколь-

ких типов беспорядочно распределенных силанольных ОН-групп (рис. 1.5). Кроме ОН-групп, в адсорбционных процессах участвуют и поверхностные силоксановые группы $\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$. Присутствующая в силикагеле вода удерживается в нем в результате взаимодействия с поверхностными силанольными группами и за счет капиллярной конденсации.

ЖАХ основана на конкурентном взаимодействии полярных групп вещества и молекул растворителя с активными центрами адсорбента на его внутренней поверхности. Поверхность силикагеля, находящегося в равновесии с подвижной фазой, всегда покрыта более или менее прочно связанным адсорбционным слоем. Если подвижная фаза содержит два или более компонентов, то состав адсорбционного слоя отличается от состава в объеме подвижной фазы. Адсорбция молекулы сорбата может происходить с вытеснением одной или нескольких молекул адсорбированного слоя или без него. Процессы взаимодействия молекул сорбата с адсорбционными слоями и поверхностью твердого адсорбента весьма сложны, главную роль в них играют ион-дипольные и диполь-дипольные взаимодействия. Селективность разделения в ЖАХ определяется не только межмолекулярным взаимодействием молекул данного сорбата, но и межмолекулярными взаимодействиями молекул ПФ как с адсорбентом, так и с молекулами сорбата, находящимися как на поверхности адсорбента, так и в адсорбционном слое и в объеме элюента. Предлагаемые модели удерживания неоднозначны и в большей или меньшей мере приближительны. Наиболее проработаны модели Снайдера, Сочевинского, Скотта и Кучеры. Раз-

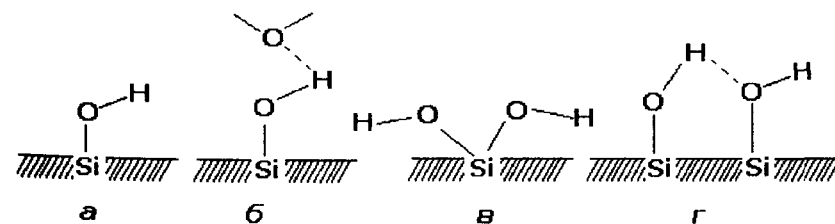


Рис. 1.5. Различные типы гидроксильных групп на поверхности силикагеля: а) свободная ОН-группа; б) связанная ОН-группа; в) геминальная ОН-группа; г) реакционноспособная ОН-группа

личные трактовки механизма хроматографии на силикагеле представлены в [52, 63, 81-93]. С критическим анализом этих моделей можно ознакомиться в работе Шатца [13].

В целом наблюдаются следующие закономерности. Удерживание возрастает: а) с увеличением полярности сорбата; б) с уменьшением числа атомов углерода в его молекуле; в) по мере уплотнения молекулы и при увеличении числа π -электронов (для полиядерных соединений). Удерживание уменьшается: а) с увеличением степени экранирования полярных групп сорбата *орто*-заместителями; б) при увеличении полярности подвижной фазы; в) по мере дегидроксирования поверхности адсорбента.

Полярность сорбата определяется числом и характером полярных функциональных групп. Ниже приведены ряды функциональных групп органических веществ, расположенных в порядке возрастания адсорбируемости на силикагеле:

$-\text{CH}_2- < -\text{CH}_3 < -\text{CH}=\text{CH}- < -\text{S}-\text{R} < -\text{O}-\text{R} < \text{NO}_2 < -\text{NH}-$ (карбазол) $< -\text{C}(\text{O})\text{OR} < -\text{C}(\text{O})\text{H} < -\text{C}(\text{O})\text{R} < -\text{OH} < -\text{NH}_2 < -\text{C}(\text{O})\text{OH}$.

$\text{F}- < \text{Cl}- < \text{Br}- < \text{I}- < -\text{OR} < -\text{NR}_2 < -\text{NO}_2 < -\text{C}(\text{O})\text{OR} < -\text{C}(\text{O})\text{R} < -\text{C}(\text{O})\text{H} < -\text{NH}_2 < -\text{NH}-\text{C}(\text{O})\text{R} < -\text{OH} < -\text{C}(\text{O})\text{OH} < -\text{SO}_3\text{H}$.

Уже некоторые несоответствия в двух приведенных выше эмпирических рядах показывают, что они носят приблизительный характер, поскольку существуют различия между алифатическими и ароматическими соединениями, имеет место влияние дипольного момента и поляризуемости молекулы, стерические факторы, кислотность адсорбента, полярность и селективность подвижной фазы.

ЖАХ на силикагеле обеспечивает наибольшую селективность при разделении соединений, имеющих различные функциональные группы и различное число таких групп. В то же время разделение веществ гомологов и вообще веществ по молекулярной массе в силу специфического механизма удерживания в этом варианте хроматографии не эффективно. Разделение членов гомологического ряда достигается только для первых членов и быстро падает с ростом числа метиленовых групп. Ограничением метода является растворимость сорбатов, они должны удовлетворительно растворяться в органических растворителях. Хроматографическая система в ЖАХ очень чувствительна к влаге, медленно стабилизируется, поэтому

градиентная хроматография на силикагеле имеет плохую воспроизводимость параметров удерживания и не целесообразна для рутинных анализов.

На рис. 1.6. представлена хроматограмма, демонстрирующая высокую селективность в разделении сложной смеси фенолов: разделены изомеры, очень сложно разделяемые методом газовой хроматографии и обладающие очень близкими свойствами такими, как *m*- и *n*-крезолы, 2,4- и 2,5-ксиленолы. Наиболее сильное влияние на удерживание фенолов оказывает, как видно, экранирование гидроксильной группы. Даже такая малообъемная и слабоэкранирующая метильная группа влияет на порядок удерживания.

Оксид алюминия, как и силикагель, широко используют в колоночной хроматографии низкого давления и в ТСХ. Сорбенты на основе оксида алюминия показали повышенную селективность по сравнению с силикагелем в разделении многоядерных ароматических углеводородов, некоторых аминов.

Химическая неоднородность и каталитическая активность поверхности Al_2O_3 выше, чем силикагеля. Оксид алюминия может вы-

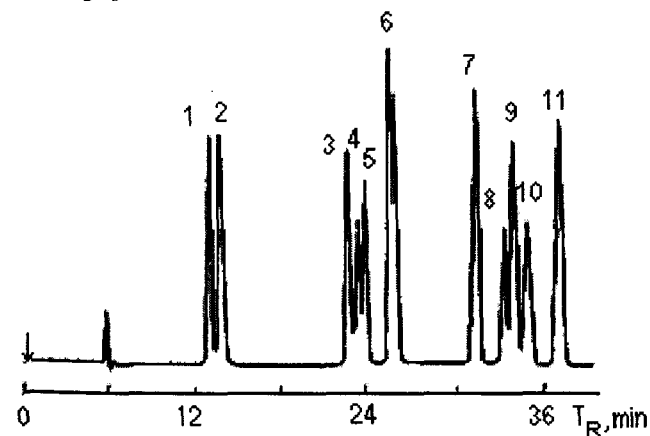


Рис.1.6. Хроматограмма фенолов, полученная в условиях ЖАХ на колонке размером 250х4.6мм с Zorbax Silica (6 мкм), ПФ гексан – метилхлорид – изопропанол (100:10:1), расход 1 мл/мин, 254 нм, проба 10 мкл: 1 – 2,4,6-триметилфенол; 2 – 2,6-ксиленол; 3 – 2,5-ксиленол; 4 – 2,3-ксиленол; 5 – 2,4-ксиленол; 6 – *o*-крезол; 7 – 3,5-ксиленол; 8 – 3,4-ксиленол; 9 – *m*-крезол; 10 – *n*-крезол; 11 – фенол [57]

зывать разложение компонентов пробы или их необратимую сорбцию. Необратимо сорбирующиеся вещества, накапливаясь на начальном участке колонки, 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 заменяется на новую или перезаполняется новым сорбентом. Однако необратимая сорбция или реакции на сорбенте приводят к получению хроматограмм, на которых полностью или частично отсутствуют чувствительные к сорбции или каталитическому разложению компоненты пробы.

1.4.2. Нормально-фазовая 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 (ПФ) и фазой на сорбенте. Неподвижная фаза (НФ) более полярна, чем подвижная, в качестве последней используют те же смеси неполярных углеводов и более полярных органических растворителей различной природы, что и в случае ЖАХ. Отличительной особенностью элюентов является только более высокая концентрация полярного модификатора. Так, для разделения этим методом малополярных веществ используют смеси типа гексан – изопропанол (95:5), гексан – хлороформ (1:1), среднеполярные вещества хроматографируют элюентами гексан – изопропанол (80:20), либо хлороформ – метанол (95:5). Для хроматографии полярных веществ часто подходящим оказывается состав хлороформ – метанол (80:20) [51].

Получение неподвижных жидких фаз на пористых носителях возможно, как и в ГЖХ, нанесением их на сорбент. Недостатком такого типа НФ является относительно быстрое вымывание фазы с носителя. За счет этого количество неподвижной жидкой фазы в колонке постепенно уменьшается, изменяя параметры удерживания сорбатов (время удерживания падает, пики становятся несимметричными). В данном случае для поддержания эффективности и селективности разделения ПФ необходимо насыщать нанесенной на

носитель НФ. Унос также уменьшается при использовании вязких и малорастворимых в элюенте полимерных фаз. В настоящее время наиболее распространено использование химически привитых к сорбенту фаз. Привито-фазные сорбенты получают, например, замещением силанольных групп, находящихся на поверхности силикагеля, в результате их реакций со специальными реагентами.

Сложность технологии прививки реагентов, подготовки исходных материалов, многостадийность процесса приводят к тому, что даже полученные по одной технологии на одной фирме-изготовителе сорбенты могут иметь неидентичные хроматографические характеристики.

Основными привитыми фазами для нормально-фазной распределительной хроматографии являются пропилнитрильная и пропиламинная фазы, которые упрощенно называют нитрильной фазой или аминофазой. Каждая из них прививается с использованием соответствующего силана (диметиламинопропилхлорсилана или диметилцианпропилхлорсилана).

Химически привитые сорбенты в варианте НФХ работают, подобно силикагелю или оксиду алюминия, с теми же элюотропными рядами растворителей и ориентировочно близкими (но не тождественными) порядками элюирования соединений разных классов. За счет разной химической природы силанольных, амино- и нитрильных групп возникает различие в селективности разделения, позволяющее отдать предпочтение тому или иному сорбенту.

К преимуществам сорбентов с привитыми нитрильными или аминогруппами по сравнению с адсорбентами относят следующие моменты:

- 1) вследствие отсутствия силанольных групп вероятность необратимой адсорбции анализируемых веществ заметно уменьшается;
- 2) значительно уменьшается влияние воды на хроматографическое разделение, отпадает необходимость строго контролировать ее содержание в растворителях;
- 3) быстро достигается равновесие с новым составом растворителя, что позволяет оперативно переходить от методики к методике или успешно использовать градиентное элюирование;

- 4) возможно использование растворителей в широком диапазоне полярностей, колонки легко регенерируются;
- 5) сорбенты с привитыми аминогруппами проявляют свойства слабых анионообменников.

При применении сорбентов с аминофазами следует принимать во внимание их реакционную способность. Не рекомендуется использовать в качестве растворителей и компонентов проб вещества с оксогруппами (альдегиды и кетоны), так как в этом случае возможно разрушение структуры привитой фазы с образованием оснований Шиффа и необратимая сорбция некоторых компонентов проб. Аминофаза может быть легко окислена, поэтому следует исключить действие на сорбент сильных окислителей. Аналогично при использовании нитрильной привитой фазы следует учитывать реакционную способность цианогруппы. Например, она способна подвергаться гидролизу в кислой или щелочной среде.

Находят применение в хроматографической практике диэтиламиноэтильные, диметиламинопропильные и диольные полярные привитые фазы. Диольная НФ содержит в составе привитого фрагмента две гидроксильные группы. Она по своим сорбционным свой-

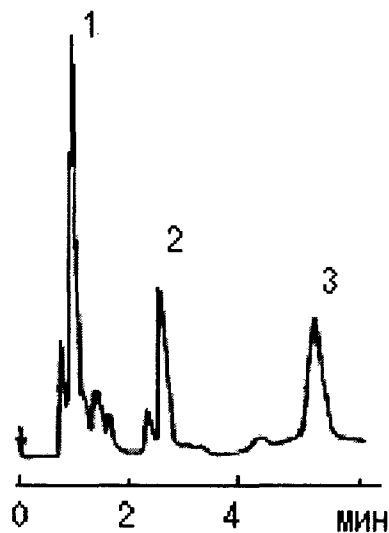


Рис. 1.7. Хроматограмма витаминов в пищевых продуктах, полученная на колонке) с нуклеосилом NH_2 (250x4 мм, зернение 10 мкм), ПФ гептан – хлороформ (80:20), расход 3,5 мл/мин, 254 нм, проба – 5 мкл: 1 – ацетат витамина А; 2 – витамин Е; 3 – витамин D_3 [57]

ствам напоминает аминофазы, но ее селективность несколько отлична, что позволяет на этой разнице добиваться в ряде случаев улучшения разделения сорбатов.

Радикальных изменений в порядке элюирования органических веществ в режиме распределительной хроматографии при замене одной неподвижной фазы на другую не происходит. Причина в том, что молекулы сорбата вступают во взаимодействие с НФ не непосредственно, а только через молекулы сольватированного растворителя, которого тем больше, чем больше сольватирующие способности растворителя и больше сольватируемость полярных групп привитой фазы. Хотя природа привитых полярных групп (нитрил, амин, диол) заметно различается, нивелирующее действие сольватационных слоев полярных компонентов подвижной фазы на границе раздела фаз сглаживает эти различия. Поэтому улучшение разрешения заменой модификатора подвижной фазы, молекулы которого по иному сольватируют полярную группу сорбата и привитой фазы, добиться значительно легче, чем заменой сорта привито-фазного сорбента. Изменение объемной доли модификаторов, использование различных добавок в подвижную фазу при сохранении той же привитой полярной группы позволяет получить существенно более значимый результат.

1.4.3. Обращенно-фазовая распределительная хроматография

Вариант распределительной хроматографии, в котором используют сорбенты с привитыми неполярными, как правило, длинными алкильными или алкилсилильными группами (а также фенильными, аминопропильными и др.), и полярный растворитель (например, водно-метанольные, водно-ацетонитрильные смеси) получили название обращенно-фазовой ВЭЖХ. Этот термин указывает на перемену полярности неподвижной и подвижной фаз на противоположные в данном варианте ВЭЖХ.

В качестве разбавителя в ОФХ используют бидистиллированную и (или) деионизированную воду, а в качестве модификаторов – преимущественно метанол и ацетонитрил, реже тетрагидрофуран. Спирты, кроме метанола, используют редко, так как их вязкость и

вязкость водно-спиртовых элюентов слишком большие, что приводит к высокому рабочему давлению, ухудшает эффективность разделения вследствие затрудненной диффузии в подвижной фазе. Тетрагидрофуран нестабилен при хранении (легко окисляется, накапливая гидропероксиды, которые уменьшают диапазон пропускания УФ света, способны окислять привитую фазу, сорбаты и взрывоопасны). 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 органических проб, чем метанол, водно-ацетонитрильные смеси менее вязки, чем смеси вода – метанол. 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. Пример хроматограммы разделения трёх дитерпеновых гликозидов стевии на аминопипильной фазе приведён на рис. 1.8.

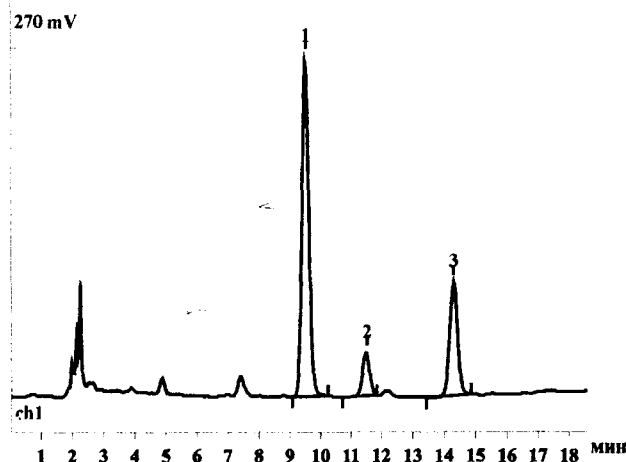


Рис. 1.8. Хроматограмма экстракта листьев стевии (1-стевииозид, 2-ребаудиозид А, 3-ребаудиозид С). Колонка: Луна NH₂, 250 x 4.6 мм. Подвижная фаза: деионизированная вода (рН5,5) (А) – ацетонитрил (В). Программа градиента: 87-82,5 % В за 12 мин., 82,5-79 % В за 8 мин., 5 % В-5 мин, 5 % В-87 % В за 1 мин, 87 % В – 3 мин. Объёмная скорость: 1.5 мл/мин. Детектирование: УФ 210 нм

Существует принципиальное различие между процессами сорбции на полярных поверхностях из относительно неполярных растворителей (НФХ) и сорбции из воды либо сильнополярных растворителей на неполярных поверхностях (ОФХ). В первом случае между молекулами сорбата и неподвижных фаз образуются ассоциаты за счет кулоновских взаимодействий или водородных связей. Во втором случае причиной ассоциации на поверхности являются так называемые сольвофобные взаимодействия в подвижной фазе. Для полярных ПФ, в особенности содержащих воду, характерно сильное кулоновское взаимодействие и образование водородных связей между молекулами растворителей. Все молекулы в таких растворителях связаны довольно прочно межмолекулярными силами. Для того чтобы поместить в эту среду молекулу сорбата, необходимо образование “полости” между молекулами растворителя. Энергетические затраты на образование такой “полости” лишь частично покрываются за счет взаимодействия полярных групп в молекуле сорбата с полярными молекулами растворителя. В аналогичном положении по отношению к растворителю находятся и неполярные молекулы неподвижной фазы. С энергетической точки зрения более выгодно такое положение, когда поверхность раздела между полярной средой (растворителем) и неполярными фрагментами неподвижной фазы и молекул сорбата минимальна. Уменьшение этой поверхности и достигается при сорбции (рис. 1.9).

Таким образом, причиной сорбции в ОФХ являются диполь-дипольные взаимодействия полярных молекул ПФ, их сильное притяжение одна к другой. Это приводит к сольвофобному вытеснению менее полярных молекул из полярной среды элюента к неполярной поверхности сорбента. Роль поверхности неподвижной фазы в ОФХ – выступать акцептором молекул сорбата, ориентированных к ней гидрофобным фрагментом, и удерживать его слабыми дисперсионными силами. Детальная интерпретация механизма сорбции на неполярных сорбентах выполнена Хорватом с сотрудниками [131-133], а качественные и количественные закономерности удерживания в зависимости от строения сорбата, типа сорбента и состава подвижной фазы проанализированы Шатцем в [13,51]. Наиболее существенными факторами удерживания сорба-

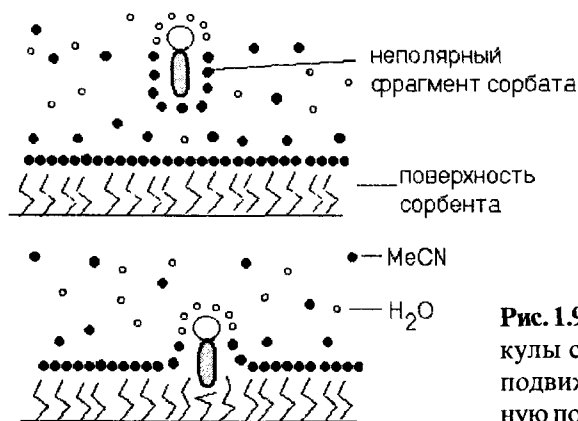


Рис. 1.9. Схема сорбции молекулы сорбата из раствора в подвижной фазе на неполярную поверхность сорбента

тов являются размеры их молекул, дипольный момент, поляризуемость и способность к гидрофобным взаимодействиям неполярной части молекулы, обеспечивающая уменьшение площади неполярной поверхности при сорбции.

Метод ОФХ в настоящее время является доминирующим в ВЭЖХ. Среди рутинных методик анализа 70-80% основаны на том или ином варианте ОФХ. Причины широкого внедрения метода в том, что для него налажено производство сорбентов, имеющих привитые алкилсилильные группы разной длины (от C₂ до C₁₈ с прямой алкильной цепью, фенильной и дифенильной группами), а растворители, используемые для этого метода (ацетонитрил, метанол, ТГФ, вода), позволяют работать с оптическими детекторами в УФ и видимом диапазоне спектра, так как они прозрачны в УФ свете.

Пределы прозрачности ПФ в зависимости от состава и химической чистоты модификатора лежат в области 190-220 нм. Наиболее доступный УФ детектор в условиях ОФХ приближается по возможностям к неселективному универсальному детектору, делаая возможным анализ углеводов, липидов, сложных эфиров, спиртов и oleфинов.

Растворители, используемые в ОФХ, относительно легко растворяют многие практически важные органические и природные вещества, находящиеся в организме человека, биологических объектах, в пище, лекарственных препаратах, и т.д.

Сорбенты в обращенно-фазовой ВЭЖХ быстро приходят в равновесие с новыми растворителями и при изменении состава растворителя, что позволяет без проблем переходить от одной методики к другой с использованием одной и той же колонки, а также широко применять градиентное элюирование с быстрым восстановлением равновесия сорбента с исходным растворителем. Сорбенты дают возможность использовать растворители в широком диапазоне свойств, а также добавки разных типов (соли, кислоты и основания, ион-парные реагенты, органические модификаторы).

Следует иметь в виду, что характеристики удерживания и селективности для обращенно-фазовых сорбентов меняются не только при переходе от сорбента одного производителя к сорбенту другого (например, от силасорба C18 к партисилу ОДС), формально имеющих одинаковую привитую фазу. Эти характеристики меняются более или менее значительно даже при переходе от одной партии сорбента к другой партии того же производителя. Исходные силикагели, используемые разными фирмами, заметно различаются по поверхности, объему и размеру пор. Для прививки фаз с общим названием C18 или ОДС применяют разные и по структуре, и по

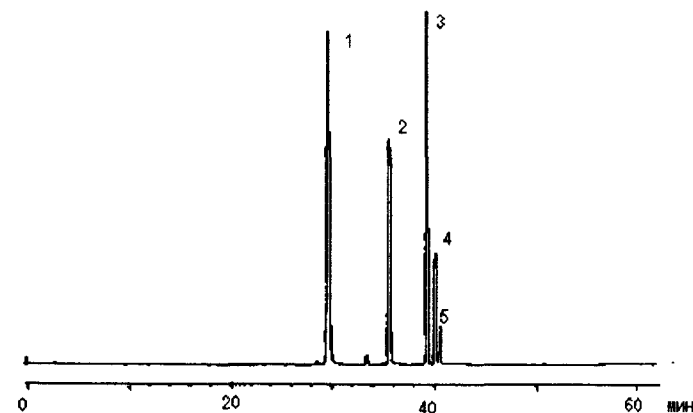


Рис. 1.10. Хроматограмма антоцианидинов в условиях градиентной ОФХ: колонка Zorbax XDB-C18, 250x4.6 мм, 5 мкм, 30 °С, 520 нм, ПФ вода – метанол – ацетонитрил (90/6/4)→(0/85/15), расход 1 мл/мин. В воду добавляли 0.05% трифторуксусной кислоты. 1 – дельфинидин, 2 – цианидин, 3 – пеларгинидин, 4 – пеонидин, 5 – мальвидин [134]

химической однородности реагенты. Например, для получения привитой фазы ОДС (октадецилсилан, ODS) используют октадецилтрихлорсилан, метилоктадецилдихлорсилан и диметилоктадецилхлорсилан. Если используют ди- или трифункциональные 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 изрядно различаются. Наконец, силанольные группы, находящиеся на поверхности исходного силикагеля, к которому 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 “эндкеппинга” (окончательного покрытия поверхности силикагеля), когда используют молекулы более активного низкомолекулярного силана (обычно триметилхлорсилана). Силанольные группы на поверхности такого привитого сорбента могут взаимодействовать с некоторыми компонентами пробы и в ряде случаев являются фактором удерживания, конкурирующим с сольвофобными процессами.

Наряду с неполярными привитыми фазами, выпускаемыми специально для ОФХ, в обращенно-фазовом варианте часто используют нитрильную и аминную привитые фазы, а иногда и диольную. В этом случае они разделяют вещества в основном по сольвофобному 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.

Одна из важных причин, способствовавших быстрому росту применения обращенно-фазовых сорбентов в ВЭЖХ, это их способность четко разделять серии гомологов в порядке возрастания их молекулярной массы. При этом гомологи могут, в отличие от разделяемых методами ЖАХ или НФХ, не иметь функциональных групп, т.е. обращенно-фазовый сорбент может разделять го-

мологи алканов, аренов, фенолов и т.д. Это вовлекает в область анализа методом ВЭЖХ такие важные объекты, как компоненты нефти и продукты нефтехимии. Если нужно разделить вещества неполярные или малополярные, практически любой обращенно-фазовый сорбент может при относительно простом подборе растворителя обеспечить почти идентичное разделение.

1.4.4. Ионообменная хроматография

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, имеющим разное сродство с фиксированным зарядом, разделяются на аниониты или на катиониты. *Аниониты* имеют на поверхности положительно заряженные группы и сорбируют из подвижной фазы анионы. *Катиониты* соответственно содержат группы с отрицательным зарядом, взаимодействующие с катионами. *Амфотерные (биполярные) иониты* содержат в своей матрице и катионные и анионные обмениваемые группы [58]. Эти иониты способны образовывать внутренние соли, которые диссоциируют в контакте с электролитами и связывают оба их компонента. Амфотерные иониты легко регенерируются водой.

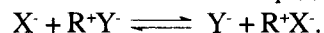
В качестве ПФ в ионообменной хроматографии используют ионные растворы (водные растворы солей, кислот и оснований), т.е. системы растворителей, имеющих высокое значение диэлектрической проницаемости и способность ионизировать соединения. Обычно работают с буферными растворами, поддерживающими определенные значения pH.

При хроматографическом разделении ионы анализируемого вещества конкурируют с ионами, содержащимися в элюенте, стремясь вступать во взаимодействие с противоположно заряженными группами сорбента. Отсюда следует, что ионообменную хроматог-

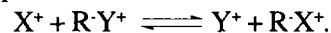
рафию можно применять для разделения любых соединений, которые могут быть каким-либо образом ионизированы.

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

Механизм анионного обмена можно представить в виде уравнения:



Аналогично уравнение для катионного обмена:



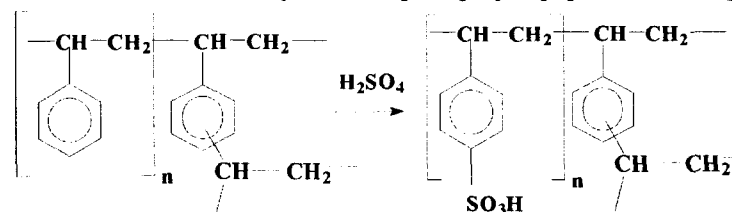
В первом случае ион образца X^- конкурирует с ионом подвижной фазы Y^- за ионные центры R^+ ионообменника, а во втором в конкуренцию с ионами подвижной фазы Y^+ за ионные центры R^- вступают катионы образца X^+ .

Естественно, что ионы анализируемой пробы, слабо взаимодействующие с ионообменником, при этой конкуренции будут слабо удерживаться в колонке и первыми вымываться из нее и, наоборот, наиболее сильно удерживаемые ионы будут элюированы из колонки последними. Кроме ионных-ионных взаимодействий, на поверхности сорбента возникают вторичные взаимодействия неионной природы за счет адсорбции или водородных связей сорбата с неионной частью матрицы или за счет ограниченной растворимости образца в подвижной фазе. Трудно добиться условий, при которых удерживание осуществляется только по ионообменному механизму. Поэтому при прогнозировании удерживания необходимо исходить не только из теоретических закономерностей ионообменной хроматографии, но и из эмпирических наблюдений. 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.

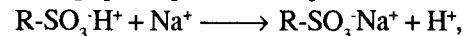
Применяемые в ВЭЖХ ионообменные смолы представляют собой в основном сополимеры стирола и дивинилбензола. Относительное содержание дивинилбензола, определяющее степень сшивки скелета ионита выражают в массовых процентах дивинил-

бензола в мономерной смеси. 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 можно получить, например, сульфированием матрицы:

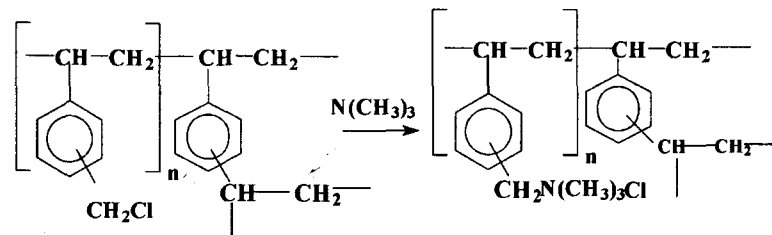


Протон сульфогруппы при диссоциации перемещается в раствор. Чтобы молекула осталась в целом электронейтральной, место протона занимает положительно заряженный ион, который из раствора переходит в смолу. Так, при действии Na^+Cl^- на катионообменную смолу в H^+ -форме происходит реакция обмена:

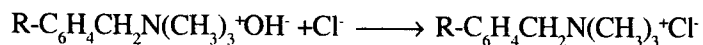


где R – органическая полимерная матрица. Если реакция протекает до конца, то смола находится в натриевой (ионной) форме. Ионы водорода и натрия, связанные с функциональными группами и способные претерпевать взаимный обмен, называют *противоионами*. Сопутствующие им противоположно заряженные ионы (в данном случае ионы Cl^-) называют *коионами*.

Анионообменные смолы получают хлорметилированием матрицы с последующим алкилированием алифатическим амином.



В настоящий момент наиболее распространены аниониты, имеющие четвертичные аммонийные группы, полученные при алкилировании триметиламином. При действии Na^+Cl^- на анионит в OH^- -форме происходит реакция обмена:

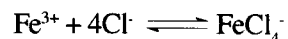


В этих смолах подвижен анион OH^- , который может замещаться другим анионом (хлором). Анионы OH^- и Cl^- в данном случае будут противоионами, а Na^+ – коионом.

Катиониты обычно поставляются в H^+ -форме или Na^+ -форме, а аниониты в OH^- -форме или Cl^- -форме.

Хроматографические 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 ионов карбоксилата $-\text{COO}^-$ или аммония $-\text{NH}_3^+$ 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 тетрахлоржелеза. 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 замещать в ионообменнике другие. Ниже приведены ряды противоионов в порядке убывающей активности и уменьшения сродства к ионообменной смоле:

для анионов $\text{HSO}_4^- > \text{ClO}_3^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{CN}^- > \text{HCO}_3^- > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{OH}^- > \text{F}^-$

для катионов $\text{Ba}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Ag}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Na}^+ > \text{H}^+ > \text{Li}^+; \text{M}^{4+} > \text{M}^{3+} > \text{M}^{2+} > \text{M}^{1+}$ [57,58].

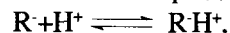
Ряды сродства ионов к основным ионообменным смолам приведены в [135-137], количественные шкалы селективности разнооб-

разных катионитов и анионитов – в [135]. Знать эти ряды и шкалы 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 М раствора соответствующей соли. Если для работы необходима форма слабее исходной, то ее сначала переводят в гидроксильную форму, промывая 20-кратным количеством 1 М раствора NaOH, а затем уже превращают в нужную форму. Катиониты переводят в требуемую форму промыванием 1 М раствором нитрата соответствующего металла.

При изменении ионной формы смолы или в присутствии органических растворителей таких, как ацетонитрил, ТГФ, 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, что 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 М 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 обменная 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” обменная 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 рН, 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 рН. При низких рН происходит нейтрализация катионита при добавлении протона:



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



Ионообменная емкость сильных катионитов примерно постоянна в диапазоне рН=2-11, но падает до нуля при низких рН, поэтому они не могут быть использованы при рН<1. Сильные аниониты должны применяться при рН<11, слабые катиониты – при рН>6, а слабые аниониты – при рН<8. Сильные ионообменники могут быть использованы в более широком диапазоне рН, чем слабые. Этим объясняется широкое применение сильных ионитов, на которых может быть разделено большее количество веществ разных классов одновременно, особенно если применяют градиентное изменение рН. Прочно удерживаемые вещества, нестойкие при крайних значениях рН, целесообразно разделять на слабых ионитах. В отличие от сильных ионитов полностью ионизированных при рН=2-11, слабые иониты полностью ионизированы в ограниченной области рН, и их ионизацией можно управлять, варьируя рН элюента в пределах диапазона рабочих значений рН.

Подвижная фаза в ионообменной хроматографии должна обеспечивать растворимость различных солей и иметь свойства буферного раствора, необходимые для ионного обмена, контроля степени удерживания компонентов пробы и получения достаточной селективности разделения.

Иногда в подвижную фазу (водные буферные растворы) добавляют небольшое количество смешивающихся с водой органичес-

ких растворителей – метанола, этанола, ацетонитрила, ТГФ. Сила и селективность растворителя зависят от типа и концентрации буферных ионов и других солей, от значения рН и от вида и концентрации добавленных органических растворителей.

Удерживание в ионообменной хроматографии лимитируется двумя процессами: распределением компонента пробы между водной подвижной фазой и органической неподвижной и образованием ионных пар (т.е. анионного или катионного обмена), причем последний процесс является доминирующим.

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 неспецифическим образом взаимодействовать с материалом матрицы.

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 рН 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 рН. Сильных буферных растворов также следует избегать из-за вероятности выпадения осадка и закупоривания колонок. Сила растворителя зависит от типа противоиона, причем степень удерживания образца увеличивается в ряду, обратном лиотропным сериям активности ионов, приведенным выше.

При анализе рН раствора выбирают таким образом, чтобы молекула сорбата была полностью ионизирована. Изменение рН подвижной фазы влияет на удерживание ионизированного сорбата – с

повышением pH времени удерживания увеличиваются при анионообменном разделении и уменьшаются при катионообменном, т.е. происходит уменьшение силы растворителя при анионном и увеличение при катионном обмене. Наиболее заметно влияние градиента pH раствора вблизи значений pK_a хроматографируемого образца.

Чаще всего в ионообменной хроматографии применяют следующие буферные растворы: ацетатный, фосфатный, цитратный, формиатный, аммиачный и боратный. Селективность разделения в ионообменной хроматографии зависит от концентрации и вида буферных ионов и органических растворителей, а также от pH среды. Ионообменное разделение можно проводить при повышенных температурах (40–60°C). Чем выше температура, тем меньше вязкость подвижной фазы. С другой стороны, более высокие температуры снижают стабильность колонки. Биохимические пробы для сохранения нативных структур и биологической активности принято разделять при низких температурах (4–20°C).

Добавка в подвижную фазу смешивающихся с водой органических растворителей (метанол, этанол, ацетонитрил, диоксан) действует аналогично добавке этих растворителей в ОФХ: элюирующая сила растет, удерживания образца снижается. Эффект более выражен для менее полярных растворителей. Добавлением органических растворителей можно добиться также изменения селективности хроматографической системы.

Таким образом, уменьшить времена удерживания в ионообменной хроматографии позволяют следующие факторы: 1) повышение температуры; 2) повышение концентрации буферного раствора; 3) снижение степени ионизации вещества за счет изменения pH.

В хроматографии биохимических смесей используют модифицированные целлюлозы – карбоксиметилцеллюлоза (слабокислотные свойства), диэтиламиноэтилцеллюлоза (среднеосновные свойства, а также гидрофильные гели декстрана (сефадексы) [58, 139–149]. На их основе выпускают иониты с карбоксиметильными, диэтиламиноэтильными, сульфэтильными, сульфопропильными и четвертичными основными группами (CM-, DEAE-, SE-, SP- и QAE-сефадексы). Декстрановые иониты подобны макропористым ионообменным смолам. Как и целлюлозные иониты, они характеризуют-

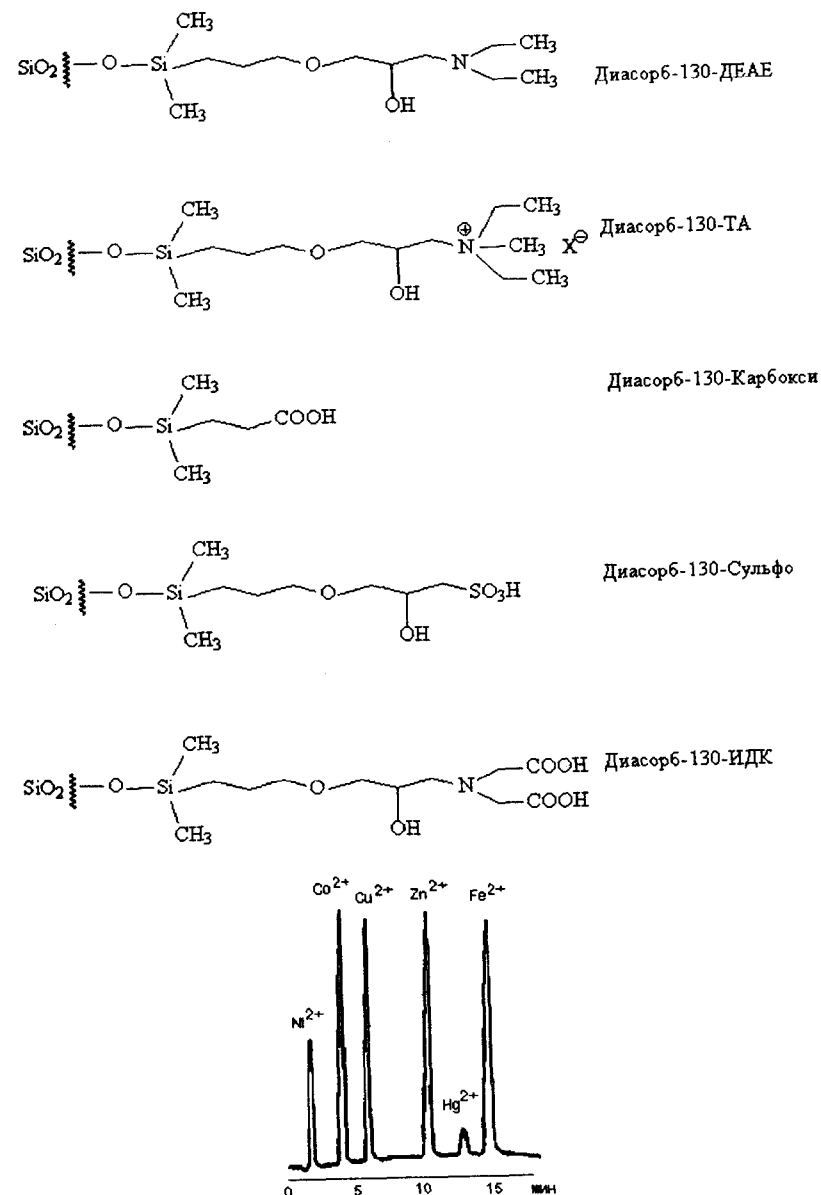


Рис.1.11. Хроматограмма ионов переходных металлов, полученная на колонке Диасорб-130-ИДК, 4x250 мм [137]

ся высокой гидрофильностью, что важно при работе с биополимерами. Они так же, как и ионообменные смолы, изготавливаются в форме шариков. Однако поры декстрановых гелей больше по диаметру, в них могут проникать макромолекулы, поэтому такие иониты широко применяются главным образом в гель-хроматографии, где ионообменный механизм удерживания имеет второстепенное значение при разделении биополимеров. Аналогичное применение имеют иониты на основе производных агарозы. Например, матрица агарозы связывается с аминокислотами для получения биполярных ионитов, которые селективно реагируют с биополимерами.

Сорбенты для ионообменной хроматографии получают также путем ковалентной прививки к силикагелю ионогенных групп. Ионообменные силикагели 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. Они характеризуются высокой термической устойчивостью и выдерживают различные виды стерилизации. Однако применение сорбентов на основе силикагеля в ионообменной хроматографии ограничено рабочим диапазоном pH, в большинстве случаев верхняя граница которого не должна превышать значений равных 6-7.

Выше представлены структуры некоторых модифицированных силикагелей для ионообменной хроматографии, выпускаемые фирмой "БиоХимМак СТ" (Россия) [137], а на рис. 1.11. – пример хроматограммы ионов.

1.4.5. Ионная хроматография

Модифицированным вариантом ионообменной хроматографии, применяемым для анализа органических и неорганических ионов, не поглощающих в УФ свете, является ионная хроматография [138-149]. В этом методе ионообменное разделение ионов сочетают с кондуктометрическим детектированием.

Различают два основных варианта ионной хроматографии (рис. 1.12).

При использовании одноколоночного варианта элюат с колонки непосредственно поступает в кондуктометрический детектор.

Детектирование происходит на фоне относительно высокой фоновой электропроводности элюента.

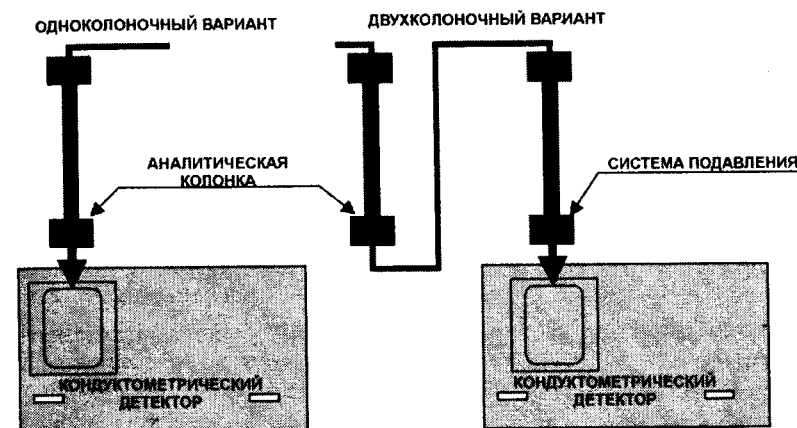


Рис. 1.12. Варианты ионной хроматографии



Рис.1.13. Разделение катионов 1-ой группы на колонке Аквилан С1Р 150х4.6мм, элюент: 4 мМ р-р азотной кислоты, скорость потока 1.5 мл/мин; кондуктометрический детектор без подавления 1 – натрий; 2 – литий; 3 – калий; 4 – аммоний

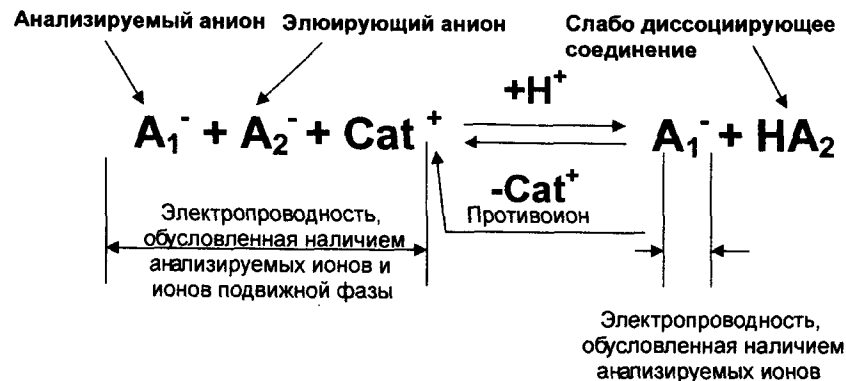


Рис. 1.14. Процессы, происходящие в катионообменной подавительной колонке

Не смотря на то, что в одноколоночном варианте ИХ чувствительность определения (при прочих равных условиях) приблизительно на 1-1.5 порядка ниже, во многих случаях применение данного варианта оправдано. В основном это касается катионов первой группы, в том числе иона аммония, обладающего высокой подвижностью. В качестве элюентов в данном случае применяются миллимолярные растворы сильных кислот. Без применения систем подавления и каких-либо дополнительных устройств возможно прямое детектирование этих катионов на уровнях 100-200 ppb, что вполне достаточно для большинства аналитических задач.

Во втором варианте фоновую электропроводность подвижной фазы подавляют пропусканием ее через специальные системы подавления фоновой электропроводности с образованием мало диссоциирующих соединений.

В самом простом варианте система подавления фоновой электропроводности элюента представляет собой подавительную колонку, заполненную ионообменником большой обменной емкости. Процессы, происходящие в катионообменной подавительной колонке, используемой для анализа анионов методом двухколоночной ИХ, представлены на рис. 1.14.

В современном оборудовании применение подавительных колонок весьма ограничено из-за двух основных недостатков: необходимости периодической регенерации и наличия больших мерт-

вых объемов, пагубно сказывающихся на всех параметрах разделения. Поэтому в последнее время все большее распространение приобретают системы капиллярного мембранного подавления фоновой электропроводности. Принцип действия таких систем аналогичен подавительным колонкам с той лишь разницей, что источником иона для подавления является не смола, а раствор данного иона, находящийся во внешнем пространстве устройства. Внешнее пространство отделено от жидкостного тракта, по которому протекает элюент полупроницаемой ионоселективной мембраной, представляющей собой модифицированные ионообменными группами фторопласты.



A_0^- – анализируемый анион;

A_1^- – анион сильной кислоты во внешнем пространстве;

A_2^- – анион слабой кислоты (элюирующий) подвижной фазы.

Устройство капиллярной системы подавления представлено на рис. 1.15.

Катионы натрия переносятся в регенерирующий раствор, что приводит к резкому снижению электропроводности элюента.

Системы данного типа имеют очень маленький мертвый объем и упрощенную процедуру регенерации. Раствор во внешнем пространстве может меняться периодически (при использовании стандартных элюентов 1 раз в 2-3 недели) или же непрерывно с использованием дополнительного насоса. В последнем случае можно добиться ощутимого увеличения глубины подавления необходимого при анализе следовых количеств ионов.

Кроме того, существуют системы подавления, использующие, помимо мембранных механизмов подавления, приложенное к по-

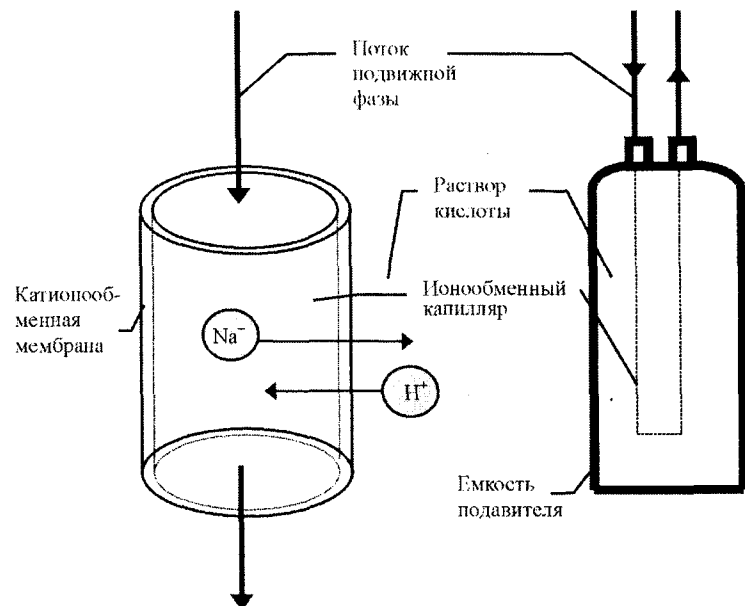


Рис. 1.15. Капиллярная система подавления

верхностям мембран электрическое поле. Такие системы называются автоматическими мембранными электродиализными системами подавления фоновой электропроводности. К их принципиальным особенностям следует отнести возможность работы в замкнутом режиме. Ионы, необходимые для подавления, извлекаются из элюата, уже прошедшего стадию подавления и детектирования. Данные системы не требуют регенерации и вообще какого-либо обслуживания. Их объективным недостатком является необходимость применения строго ограниченного спектра элюентов.

Как уже отмечалось выше, при использовании систем подавления возможно резкое увеличение чувствительности анализа. Так, при определении следовых количеств неорганических анионов возможно устойчивое детектирование на уровне единиц ppb при прямом (без концентрирования) вводе образца.

Элюенты, предназначенные для двух колоночной системы, должны отвечать двум основным требованиям. Во-первых, они должны вытеснять ионы из разделительной колонки. Во-вторых, они

должны вступать в реакции обмена в подавительной системе с образованием слабо диссоциирующих соединений, обладающих низкой проводимостью.

В связи с тем, что в этом методе применяют сильноокислые и сильноосновные элюенты, которые могли бы вызвать значительную коррозию в обычных хроматографических системах, хроматографический тракт в ионных хроматографах изготавливают из химически инертных материалов.

Ионная хроматография имеет обширное практическое приложение. В водоподготовке она позволяет осуществлять контроль качества сырой воды; контролировать работу обессоливающих установок. В контроле воды электростанций она полезна при анализе качества пара; питательной воды; в анализе продувочной воды парогенераторов. В ядерной энергетике ионная хроматография нашла применение в контроле радиоактивных выбросов и в анализе воды первого и второго контуров.

Широкое распространение ионной хроматографии обусловлено рядом ее достоинств:

- а) возможностью определять большое число неорганических и органических ионов, а также одновременным определением катионов и анионов;

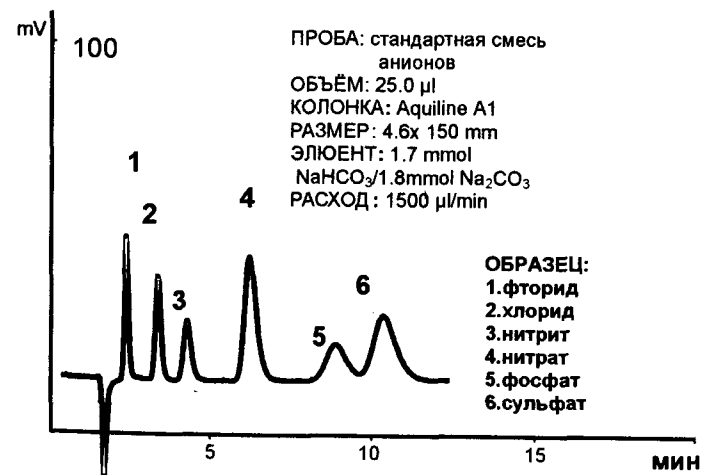


Рис. 1.16. Хроматограмма разделения стандартной смеси анионов

- б) высокой чувствительностью определения (до 1 ppb без предварительного концентрирования);
- в) высокой селективностью и экспрессностью (можно определять 10 ионов за 10-15 минут, а при градиентном элюировании – 22 иона за 25 мин);
- г) малым объемом анализируемой пробы (требуется не более 2 мл образца);
- д) широким диапазоном определяемых концентраций (от 1 ppb до 1000 ppm без разбавления).

1.4.6. Ион-парная хроматография

Во всех рассмотренных выше вариантах ЖХ удержание в конечном счете определялось сродством частиц сорбата с поверхностью сорбента. Качественно новые свойства хроматографические системы могут приобретать, если в ПФ вводят динамический модификатор. Под этим термином обозначают такой компонент, который постоянно поступает в колонку вместе с ПФ и, находясь в динамическом равновесии с другими компонентами системы, изменяет механизм сорбции и селективность системы. Практически важным частным случаем динамического модифицирования является метод ион-парной хроматографии [13,97,104]. Суть метода заключается в динамическом модифицировании обращенно-фазового сорбента (октил-, октадецилсиликагеля) группами, обладающими ионообменными свойствами. Для этих целей в типичные подвижные фазы для ОФХ добавляют гидрофобные органические соединения с ионогенными группами. Для разделения оснований используют алкилсульфаты натрия (алкил от C_4 до C_{12}) в количестве 0.001-0.01 моль/л, создавая буферным раствором $pH=2-5$. Для разделения кислот применяют соли тетраалкиламмония (фосфат тетрабутиламмония, бромид цетилтриметиламмония и др.) в концентрациях 0.001-0.01 моль/л и $pH=3-7$. В ион-парном режиме селективность разделения неионогенных компонентов анализируемой пробы будет лимитироваться обращенно-фазовым механизмом удерживания, а удерживание оснований и кислот заметно возрастет, улучшится форма их хроматографических пиков.

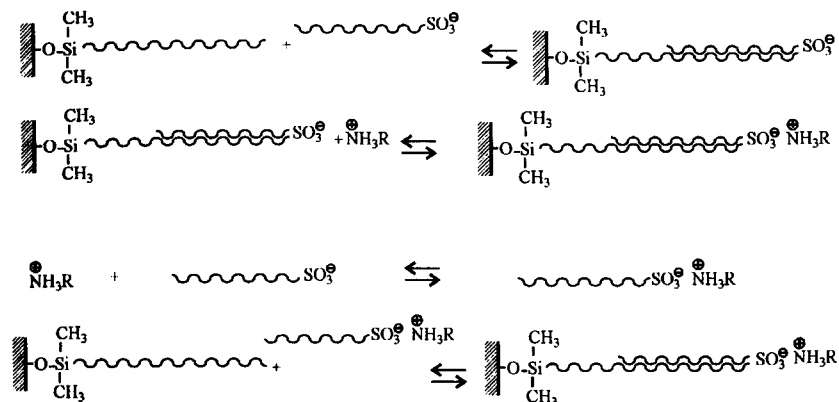


Рис.1.17. Возможные варианты механизма ион-парной хроматографии на алкилсиликагеле [13]

Удержание в ион-парном режиме обусловлено достаточно сложными равновесными процессами, конкурирующими между собой. С одной стороны, за счет гидрофобных взаимодействий и эффекта вытеснения из полярной среды подвижной фазы возможна сорбция гидрофобных ионов на поверхности алкилсиликагеля таким образом, что алкильный фрагмент динамического модификатора прижат к поверхности, а заряженные группы обращены к подвижной фазе. В этом случае поверхность приобретает ионообменные свойства и удержание подчиняется закономерностям ионообменной хроматографии. С другой стороны, возможно образование ионной пары непосредственно в объеме элюента, затем эта пара сорбируется на неполярной поверхности по обращенно-фазовому механизму.

1.4.7. Лигандообменная хроматография

Лигандообменная хроматография, впервые предложенная Даванковым [152], также основана на динамическом модифицировании. В этом методе и неподвижная, и подвижная фаза могут содержать комплексообразующий ион металла, в результате чего разделение смеси веществ происходит за счет различия в константах комплексообразования веществ и разницы в коэффициентах распределения

комплексов между подвижной и неподвижной фазами. Под *лигандом* понимают нейтральную молекулу или анион, связанный с ионом металла координационной связью. Путем обобществления неподеленной электронной пары донорного атома лиганда центральный катион металла достраивает свою электронную оболочку до структуры, аналогичной электронной оболочке атома инертного газа. Если связь лиганд – металл лабильна, один лиганд может замещать другой. Основы метода и его приложение в биохимии и биотехнологии изложены в [152-156]. Он показал себя наиболее эффективным при разделении рацемических смесей аминокислот. Чаще всего в роли хирального разделяющего агента используют комплексы двухвалентной меди, двухвалентного цинка или никеля с L-пролином, L-гидроксипролином или L-фенилаланином. Применяют лиганды и с кадмием (II), и с ртутью (II), и с серебром (I). Ионы кадмия находят применение с серосодержащими лигандами, включая тиомочевину. Ионы серебра, введенные в состав ионообменной смолы, употребляют при хроматографировании гетероциклических оснований и ненасыщенных соединений. Ртуть (II) обладает большим сродством к серосодержащим лигандам.

Возможны ионообменный, ион-парный и обращенно-фазовый вариант лигандообменной хроматографии. Один из них предусматривает ковалентное связывание оптически активного агента, чаще всего аминокислоты, с матрицей сорбента. В хроматографическую систему подают подвижную фазу, содержащую ионы металла-комплексобразователя. Эти ионы связываются с оптически активным сорбентом. Модифицированный таким образом сорбент может образовывать диастереомерные хелатные комплексы. Например, если к сорбенту привита L-аминокислота, он может с рацемическим сорбатом образовывать L,L- и L,D-комплексы. Устойчивость этих комплексов различна, в результате этого параметры удерживания энантиомеров не одинаковы. В другом варианте лигандообменной хроматографии неполярный сорбент динамически модифицируется гидрофобным производным оптически активной аминокислоты, затем на нем фиксируется ион металла-комплексобразователя и при хроматографировании энантиомеров реализуется лигандообменный процесс. В третьем варианте используется стандартный

обращенно-фазовый сорбент, модифицируется подвижная фаза. В этом случае диастереомерные комплексы образуются в элюенте, а сорбент энантиоселективными свойствами не обладает. Разделение достигается только за счет разной сорбируемости комплексов на гидрофобной поверхности неспецифической неподвижной фазы.

Сорбенты, используемые для удерживания катионов в лигандообменной хроматографии могут быть органическими, неорганическими или представлять собой комбинацию органических и неорганических структур, например, силикагели с привитыми функциональными группами [57, 152-156]. Наиболее распространенный органический катионообменник – сульфированный полистирол, сшитый дивинилбензолом. Степень сшивки 6-8%. Двухзарядные ионы, используемые в лигандообменной хроматографии, вызывают электростатическое притяжение полимерных цепей, уменьшают набухаемость частиц, делая их более жесткими и устойчивыми к высокому давлению.

Таблица 1.2. Времена удерживания (мин.) углеводов и многоатомных спиртов на колонках Rezex (*)

Соединение/ионная форма	Ag ⁺	Ca ²⁺	Na ⁺	H ⁺	Pb ²⁺
D-(-) - Арабиноза	13.01	13.56	12.65	11.24	16.47
D-(-) - Фруктоза	12.05	13.65	11.76	10.31	17.71
D-(-) - Галактоза	11.87	11.73	11.47	10.19	14.94
D-(-) - Глюкоза	11.04	10.37	10.71	9.62	12.92
Инозитол	12.59	13.35	12.14	9.98	18.87
D- Мальтоза	9.16	8.81	8.75	8.18	11.59
Мальтотриоза	8.27	8.10	7.94	7.51	11.02
D-Маннитол	11.36	17.82	10.80	10.59	24.90
D-(+) - Манноза	12.04	12.04	11.54	10.16	16.39
L-(+) - Рамноза	11.50	12.18	11.00	10.90	14.47
D-(-) - Рибоза	14.59	23.38	14.34	11.42	33.48
D-Сорбитол	11.91	22.45	11.39	10.83	35.97
Сахароза	9.03	8.71	8.65	9.24	11.00
Ксилитол	12.69	22.01	12.16	11.78	32.38
D-(+) - Ксилоза	12.06	11.62	11.68	10.24	13.84

* Условия хроматографирования : элюент – вода, температура 80 °С, расход – 0.6 мл/мин, детектор – РМД.

В качестве ПФ используют водные растворы аммиака в смеси с ацетонитрилом. Оптимальное соотношение воды и ацетонитрила находится в области эквиомных составов (примерно 1:1), концентрация аммиака 0.15-0.2 М. В ПФ могут добавлять соли соответствующего металла-комплексобразователя. Следует помнить, что силикагель растворяется в щелочных растворах, добавка органического растворителя уменьшает растворимость сорбента. Вместо аммиака в ряде случаев использовали пиридин. При разделении аминокислот на сульфированной полистирольной смоле, заряженной ионами цинка, в качестве подвижной фазы использовали буферные растворы ацетата натрия (рН=4.1), содержащие $3.5 \cdot 10^{-5}$ М цинка.

Другим распространённым применением лигандообменного механизма является разделение моно- и олигосахаридов, а также полиольных соединений. Разделение происходит за счёт образования лигандного комплекса с ионом металла, иммобилизованным на поверхности катионообменной смолы. В разделение вовлечены также такие механизмы, как сайз-эксклюзия, распределительный механизм, гидрофобная адсорбция, а также электростатическое притяжение и отталкивание. Сорбенты для лигандообменного разделения углево-

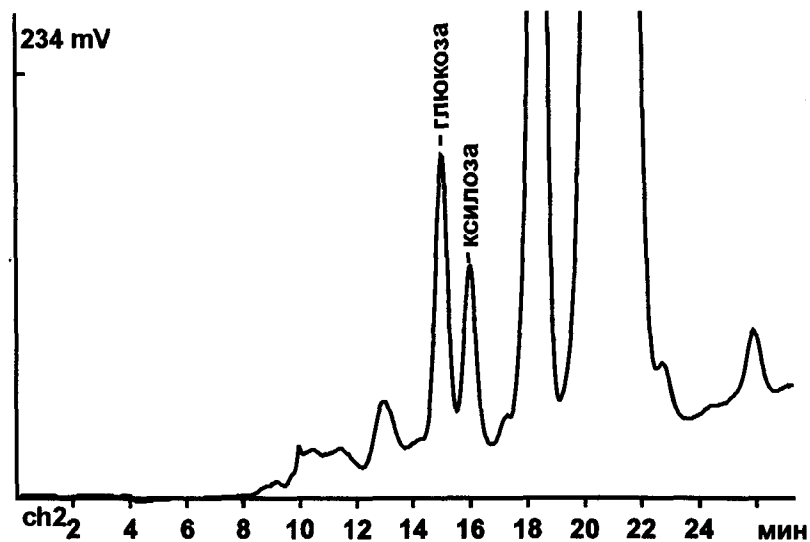


Рис.1.18. Хроматограмма углеводов в пробе растворимого кофе

дов представляют собой, как правило, сульфированный сополимер стирола и дивинилбензола со степенью сшивки 4 – 8%, на поверхности которого электростатически иммобилизован катион одно-, двух- или трёхвалентного металла (Na^+ , Ag^+ , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Pb^{2+} , Ba , Y^{3+} , La^{3+} , или Pr^{3+}). В качестве подвижной фазы обычно используют деионизованную воду. В качестве примера колонок для лигандообменного разделения углеводов можно привести колонки серии REZEX (Феноменекс, США). В табл. 1.2. приведены времена удерживания некоторых соединений на колонках REZEX в различных ионных формах, а на рис. 1.18 – пример типовой хроматограммы лигандообменного разделения углеводов в пробе растворимого кофе (свидетельство об аттестации МВИ № 22-03, ЗАО “НПКФ Аквилон”, Россия).

1.4.8. Афинная хроматография

Методом афинной хроматографии разделяют полипептиды, белки и другие макромолекулы биологически активных веществ [12, 23-28, 35-44, 48-50, 152-174]. Разделение происходит за счёт различия в их биоспецифическом взаимодействии с комплементарными сорбционными центрами неподвижной фазы. По сути это вариант лигандообменной хроматографии, дополняющий эксклюзионную и ионообменную хроматографию, применение которого необходимо, если важно сохранить активность, повысить выход и степень очистки препаративно выделяемого компонента.

Схематично механизм разделения в афинной хроматографии представлен на рис. 1.19. Лиганд L фиксируется на матрице, целевой компонент разделяемой смеси S связывается лигандом и извлекается из раствора, в последующей стадии элюирования комплекс разрушается и сорбат вновь переходит в раствор. Взаимодействие вещества и лиганда должно быть обратимым. Лиганд при помощи реакционно-способных групп осуществляет связь с матрицей, сохраняя при этом биоспецифическую активность. Активные центры многих биологически активных веществ часто локализованы в середине глобулы и недоступны для небольших структур лигандов, непосредственно связанных с матрицей. Поэтому между матрицей и лигандом часто встраивают дополнительный блок – спейсер.

Для афинной хроматографии выпускают материалы с различными реакционно-способными группами. В качестве матрицы служат разнообразные гели на основе агарозы или полиакриламида. Тип геля выбирают по виду функциональных групп лиганда. Известны матрицы, на которых лиганды могут быть иммобилизованы только с помощью конденсирующих агентов. Например, в качестве конденсирующих агентов применяют водорастворимые производные карбодиимида (N-этил-N'-(3"-диметиламинопропил)-карбодиимидгидрохлорид и др.).

Лигандообменную хроматографию белков называют также металло-хелат-афинной хроматографией.

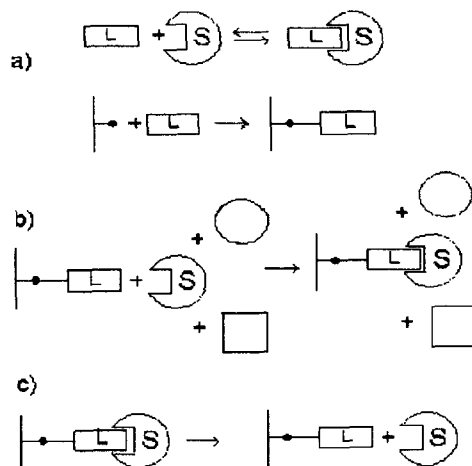
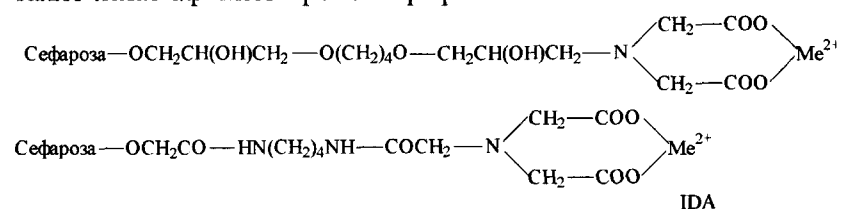


Рис. 1.19. Механизм разделения веществ в афинной хроматографии: а) иммобилизация лиганда на матрице; б) нековалентное связывание целевого вещества и удаление сопутствующих примесей; в) десорбция целевого компонента

Как показано выше, активные центры сорбента, удерживающие сорбат, обычно представляют собой систему ион переходного металла – иминодиацетатная группа, связанная с матрицей через длинные кислород- или азотсодержащие мостики.

Матрица сорбента должна быть доступной для макромолекул белка, чтобы обеспечить возможность образования разнолигандных сорбционных комплексов. Этому условию удовлетворяют гели с высокой набухаемостью (сефадексы

6В, СМ-сефадексы С-50, трисакрил GF 2000 и другие так называемые аффи-гели) и слабосшитые ионообменники. В качестве подвижной фазы используют буферы в интервале значений pH от 6 (ацетатный буфер) до 8 (фосфатный буфер). Можно создать такие условия (значения pH и концентрация солей), при которых взаимодействие целевого сорбата с лигандом будет наиболее сильным. Десорбцию и элюирование связанного белка осуществляют тремя способами. Так, при понижении pH подвижной фазы происходит протонирование донорных групп белка и диссоциация его сорбционного комплекса.

Следует помнить, что иминодиацетатные группы неподвижной фазы также способны протонироваться и терять связанный с ними ион металла, в связи с этим pH меньше 5 нежелательны. Молекулы белка можно вытеснить из сорбента лигандным обменом, используя имидазол. Последний образует более устойчивый комплекс. Наконец, сорбционные комплексы можно разрушить при низких pH средним по силе хелатообразующим агентом (гистидином) или сильным хелатирующим агентом (этилендиаминтетрауксусной кислотой), что приводит к освобождению белка и десорбции металла. Этот способ эффективен для выделения ферментов, принадлежащих к классу металлопротеинов. Молекулы белка, не имеющие на своей поверхности остатков гистидина или триптофана, не удерживаются гелем IDA-Cu²⁺, а присутствие хотя бы одного остатка гистидина в молекуле белка достаточно для его удерживания гелем IDA-Cu²⁺ при нейтральном значении pH. Для удерживания белков, содержащих триптофан, требуется несколько остатков этой аминокислоты в молекуле белка. Если сорбат слишком прочно связан с лигандом, в состав буфера вводят анионы ClO⁺, CF₃COO⁻, SCN⁻, CCl₃OO⁻, разрушающие водородные связи.

В афинной хроматографии выделяют специальный способ, названный афинной хроматографией на лабильных лигандах. Этот вариант разработан для того, чтобы преодолеть необратимую сорбцию ряда специфических белков к кобаламину, который используется в качестве привитого к матрице хелата. Вместо ковалентной иммобилизации этого хелата гидроксикобаламин или цианокобаламин предварительно координируют с матрицей сефарозы, содержащей первичные аминогруппы. Белки, специфически связываю-

щиеся с кобаламином, селективно сорбируются на холоде (4°C) на полученной неподвижной фазе. Затем их выделяют снова в форме комплексов с кобаламином путем повышения температуры колонки до 37°C , при которой происходит разрушение координационных связей с кобаламином. В методе афинной хроматографии на лабильных лигандах в ходе сорбции образуется одна координационная связь, а в процессе десорбции диссоциирует другая координационная связь, так что центральный ион металла вместе с дополнительным (лабильным) лигандом изменяет свою локализацию, переходя из неподвижной фазы к лабильному лиганду [152].

К настоящему времени разработан широкий ряд хелатообразующих сорбентов, позволяющих разделять на основе биоспецифических взаимодействий [152-174].

1.4.9. Эксклюзионная хроматография

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, т.е. неподвижной фазой служит пористое тело или гель, а различное удерживание веществ обусловлено различиями в размерах молекул веществ, их форме и способности проникать в поры неподвижной фазы. В названии метода отражен механизм процесса, от английского термина "*Size Exclusion*", означающего "исключение по размеру". Гель-проникающая хроматография (ГПХ) – эксклюзионная хроматография, в которой неподвижной фазой служит гель.

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.

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 высокомолекулярных веществ и биополимеров [12,14,57,175-191].

Рассмотрим принципиальные основы метода. Объем эксклюзионной колонки можно выразить суммой трех слагаемых:

$$V_c = V_m + V_i + V_d \quad (1.23)$$

где V_m – мертвый объем (объем растворителя между частицами сорбента, иначе говоря, 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_i представляет собой сумму объемов подвижной и неподвижной фаз:

$$V_i = V_m + V_f \quad (1.24)$$

Удерживание молекул в эксклюзионной колонке определяется вероятностью их диффузии в поры и зависит главным образом от соотношения размеров молекул и пор, что схематически показано на рис. 1.6. Коэффициент распределения K_d , как и в других вариантах жидкостной хроматографии, представляет собой отношение концентраций вещества в неподвижной и подвижной фазах:

$$K_d = C_i / C_o \quad (1.25)$$

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. 1.20.), и поэтому движутся через колонку наиболее медленно. Их удерживаемый объем равен полному объему растворителя V_i . 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_m . Коэффициент распределения для этих молекул равен нулю.

Связь между удерживаемым объемом и молекулярной массой (или размером молекул) образца описывается частной калибровочной кривой (рис. 1.21.), т.е. каждый конкретный сорбент характеризуется своей калибровочной кривой, по которой оценивают область разделяемых на нем молекулярных масс. Точка А соответствует пределу эксклюзии, или мертвому объему колонки V_m . Все молекулы, масса которых больше, чем в точке А, будут элюироваться одним пиком с удерживаемым объемом V_m . Точка В отражает предел проникания, и все молекулы, масса которых меньше,

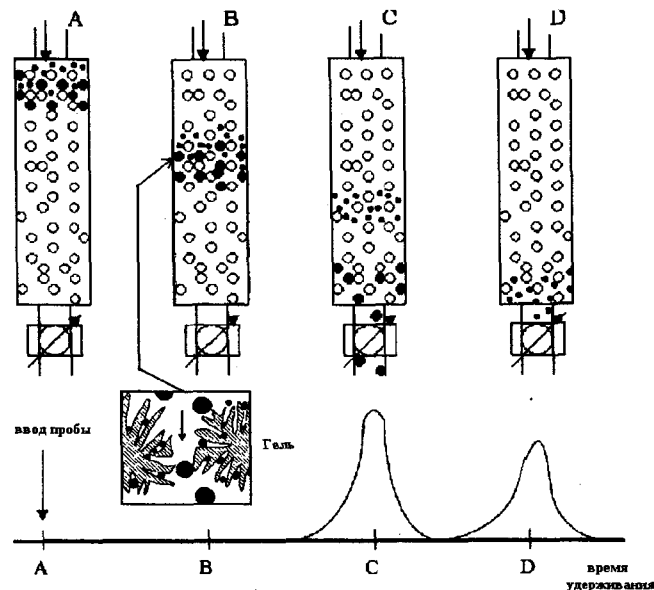


Рис. 1.20. Принцип разделения и детектирования пробы в эксклюзионной хроматографии. А – ввод образца; В – разделение по размерам; С – выход крупных макромолекул; D – выход мелких макромолекул

чем в точке В, также будут выходить из колонки одним пиком с удерживаемым объемом V_i . Между точками А и В располагается диапазон селективного разделения. Соответствующий ему объем

$$V_i = V_t - V_m \quad (1.27)$$

принято называют рабочим объемом колонки. Отрезок CD представляет собой линейный участок частной калибровочной кривой, построенной в координатах $V_R - \lg M$. Этот участок описывается уравнением

$$V_R = C_1 - C_2 \lg M, \quad (1.28)$$

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 за-

метно снижается. Кроме того, нелинейная связь между $\lg M$ и V_R существенно усложняет обработку данных и снижает точность результатов. Поэтому стремятся 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_i , то это указывает на проявление других механизмов разделения (чаще всего адсорбционного). Адсорбционные эффекты обычно проявляются на жестких сорбентах, но иногда наблюдаются и на полужестких гелях, видимо, из-за повышенного сродства к матрице геля. Примером может служить адсорбция ароматических соединений на стиролдивинилбензолных гелях.

По-видимому, изменением параметров взаимодействия в системе полимер – сорбент – растворитель можно переходить от адсорбционного механизма к эксклюзионному и наоборот. В общем случае в эксклюзионной хроматографии стремятся полностью подавить адсорбционные и другие побочные

эффекты, так как они, особенно при исследовании молекулярно-массового распределения (ММР) полимеров, могут существенно исказить результаты анализа. Одним из мешающих факторов является гидродинамический режим хроматографирования, в котором роль неподвижной фазы играют стенки колонки (канала), и разделение смеси макромолекул или частиц происходит вследствие различия скоростей протекания подвижной фазы вдоль оси канала и у его стенок, а также за счет распределения разделяемых частиц по сечению канала в соответствии с их размером.

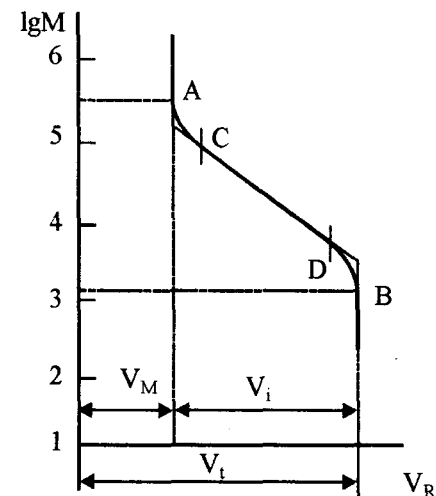


Рис. 1.21. Эксклюзионная калибровочная кривая. Отрезок CD – линейный участок частной калибровочной кривой. V_m – мертвый объем, V_i – рабочий объем колонки

Принципиальными отличиями эксклюзионной хроматографии от других вариантов являются априори известная продолжительность анализа в конкретной используемой системе, возможность предсказания порядка элюирования компонентов по размеру их молекул, примерно одинаковая ширина пиков во всем диапазоне селективного разделения и уверенность в выходе всех компонентов пробы за достаточно короткий промежуток времени, соответствующий объему V_r . Данный метод применяют преимущественно для исследования ММР полимеров и анализа макромолекул биологического происхождения (белки, нуклеиновые кислоты и т.д.), но 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.

В эксклюзионной хроматографии полимеров предъявляются наиболее жесткие требования к стабильности потока подвижной фазы. Точность результатов в эксклюзионной хроматографии полимеров заметно зависит от температуры. При ее изменении на 10°C ошибка определения средних молекулярных масс превышает $\pm 10\%$ [57]. Поэтому в данном варианте ВЭЖХ обязательно термостатирование разделительной системы. Как правило, достаточна точность поддержания температуры $\pm 1^\circ\text{C}$ в пределах до $80-100^\circ\text{C}$. В некоторых случаях, например, при анализе полиэтилена и полипропилена, рабочая температура составляет $135-150^\circ\text{C}$. Наиболее распространенным детектором в эксклюзионной хроматографии полимеров является дифференциальный рефрактометр.

Выбор сорбентов, обеспечивающих оптимальные условия для решения конкретной аналитической задачи, проводят в несколько этапов. Матрица геля должна быть химически инертной, т.е. в ходе эксклюзионной хроматографии не должно происходить химическое связывание разделяемых макромолекул. При разделении белков, ферментов, нуклеиновых кислот, при контакте с матрицей не

должна происходить их денатурация. 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 стиролдивинилбензольными 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 [175-191]. Затем по калибровочным кривым или данным о диапазоне фракционирования 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.

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, т.е. были максимально выражены концентрационные эффекты.

Растворимость образца обычно является главным лимитирующим фактором, ограничивающим ассортимент пригодных подвижных фаз. Наилучшим органическим растворителем для эксклюзионной хроматографии синтетических полимеров по комплексу свойств является ТГФ. Он обладает уникальной растворяющей способностью, низкой вязкостью и токсичностью, лучше многих других растворителей совместим со стиролдивинилбензольными 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 °С), 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 (ионол, сантонокс R и др.).

Жесткие сорбенты совместимы с любыми подвижными фазами, имеющими $pH < 8.5$. При более высоких значениях pH силикагель начинает растворяться и колонка необратимо теряет эффективность. Стиролдивинилбензольные гели совместимы в основном

с элюентами умеренной полярности. Для работы на колонках с μ -стирогелем (от 1000 Å и выше) 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 100E и 500 E) 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 ДМФА.

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 тем-

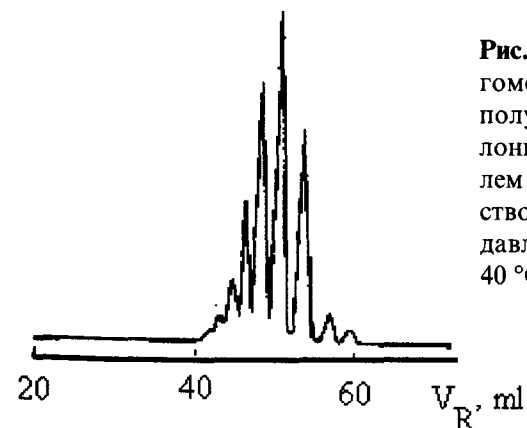


Рис. 1.22. Хроматограмма олигомеров полиэтиленгликоля, полученная на составной колонке 2 (600X7.5) мм с TSK-гелем G2000PW, ПФ 0.05 М раствор NaCl, расход 1 мл/мин, давление 2 МПа, температура 40 °С, рефрактометр [57]

пературах, 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. Значительно более сильными модификаторами являются этиленгликоль и полигликоли с различной молекулярной массой (ПЭГ-200, ПЭГ-400, карбовакс 20 М). Иногда, например при анализе поликислот в диметилформамиде, требуется добавка достаточно сильных кислот [79]. Следует отметить, что полностью устранить адсорбцию добавкой модификаторов удается не всегда. В таких случаях нужно использовать полужесткие гели. Некоторые полимеры хорошо растворяются только в высоко полярных растворителях (ацетон, диметилсульфоксид и т. п.), несовместимых со стиролдивинилбензольными гелями. При их разделении на жестких сорбентах выбор растворителя проводят в соответствии с общими принципами, изложенными выше.

Свои характерные особенности имеет эксклюзионная хроматография в водных средах. Из-за специфики многих разделяемых систем (белки, ферменты, полисахариды, полиэлектролиты и др.) и разнообразия применяемых сорбентов существует очень много вариаций состава ПФ для подавления различных нежелательных эффектов. В качестве сорбентов применяют декстрановые гели (сефадексы), полиакриламидные, оксиакрилметакрилатные гели, гели агарозы и др. В процессе эксклюзионного хроматографирования поведение макромолекул определяется в первую очередь их гидродинамическими размерами, а характерной особенностью белков, ферментов и синтетических полиэлектролитов является зависимость размеров макромолекул от pH и ионной силы раствора. Чем меньше значение pH и ионной силы раствора, тем выгоднее становятся развернутые конформации макромолекул (так называемое полиэлектролитное набухание). В этом случае среднестатистические размеры растут, что приводит к уменьшению объемов удерживания в режиме эксклюзионной хроматографии. Общими приема-

ми модификации является добавка различных солей и применение буферных растворов с определенным значением pH. В частности, поддержание $\text{pH} \leq 4$ дает возможность подавить слабую ионообменную активность силикагелей, обусловленную присутствием на их поверхности кислых силанольных групп. Требуемая ионная сила подвижной фазы достигается при концентрации буферного раствора 0,05-0,6М; оптимальную концентрацию подбирают экспериментально. Для предотвращения ионообменной сорбции катионных соединений наиболее часто используют такой активный модификатор, как тетраметиламмонийфосфат при $\text{pH}=3$. 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.

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.

Принципиальная черта эксклюзионной хроматографии высокомолекулярных синтетических полимеров заключается в невозможности разделения смеси на индивидуальные соединения. Эти вещества представляют собой смесь полимергомологов с различной степенью полимеризации и соответственно с разными молекулярными массами M_i . Молекулярную массу таких смесей можно оценить некоторой средней величиной, которая зависит от способа усреднения. Содержание молекул каждой молекулярной массы M_i определяют либо по их численной доле в общем числе полимерных молекул, либо по массовой доле в их общей массе. Обычно полимер характеризуют найденными этими способами средними величинами,

которые называют соответственно среднечисленной M_n и средне-массовой M_w молекулярной массой. Значения M_n дают, например, криоскопия, осмометрия, эбулиоскопия, а значения M_w – светорас-сеяние и ультрацентрифугирование.

Если обозначить число молекул с молекулярной массой M_i через N_i , то общую массу полимера можно выразить через $\sum M_i N_i$, численную долю молекул с массой M_i через $N_i / \sum N_i$, а массовую долю молекул с массой M_i – через $f_i = M_i N_i / \sum M_i N_i$. 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:

$$M_n = 1 / (f_i / M_i) = (\sum M_i N_i) / (\sum N_i) \quad (1.29)$$

$$M_w = \sum M_i f_i = (\sum M_i^2 N_i) / (\sum M_i N_i) \quad (1.30)$$

Отношение M_w / M_n характеризует полидисперсность полимера.

На практике молекулярную массу полимеров часто определяют методом вискозиметрии. Средневязкостную молекулярную массу находят по уравнению Марка – Куна – Хаувинка:

$$[\eta] = K_\eta M_\eta^a, \quad (1.31)$$

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

Величина M_η описывается уравнением

$$M_\eta = (\sum M_i^a f_i)^{1/a}. \quad (1.32)$$

Как правило, величины средних молекулярных масс удовлетворяют неравенству

$$M_w > M_\eta > M_n. \quad (1.33)$$

Обычно полимерный образец характеризуют комплексом значений M_w , M_η , 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 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.

1.4.10. Ионоэксклюзионная хроматография

Ионоэксклюзионная хроматография является широко известным эффективным методом, вторая волна популярности которой наблюдается в настоящее время. В основе данного механизма разделения лежит эффект доннановского распределения, в результате которого соединения в ионизированной форме не удерживаются на ионообменнике, тогда как соединения в молекулярной форме распределяются между неподвижной водной фазой внутри пор ионообменника и подвижной фазой, мигрирующей в пространстве между частицами сорбента. Разделение основано на электростатическом отталкивании, полярных и гидрофобных взаимодействиях между растворённым соединением и сорбентом.

Механизм разделения схематично приведён на рис. 1.23. и в упрощённом виде может быть описан как “отторжение” ионов анионо- или катионообменными сорбентами и удерживание соединений в молекулярной форме за счёт совокупности полярных и гидрофобных взаимодействий. Слой сорбента можно условно разделить на три части: I – твёрдая матрица катионообменного сорбента с анионогенными функциональными группами на поверхности, II – жидкости (молекул воды), находящейся внутри пор сорбента и образующей стационарный “гидрофильный щит”, III – подвижной фазы, мигрирующей между частицами сорбента. Анионогенные группы на поверхности сорбента действуют как полупроницаемая “доннановская мембрана” между стационарной (II) и подвижной (III) жидкими фазами. Отрицательно заряженные компоненты не достигают стационарной подвижной фазы II, так как отталкиваются одноимённо заряженными функциональными группами и покидают колонку с “мёртвым” (свободным) объёмом. Компоненты в молекулярном виде не “отторгаются” катионообменным сорбентом и распределяются между стационарной (II) и подвижной (III) жидкими фазами. Различие степени удерживания неионных компонентов смеси продиктовано совокупностью полярных взаимодействий неионных компонентов смеси с функциональными группами катионообменного сорбента и гидрофобных взаимодействий неионных компонентов смеси с неполярной матрицей сорбента.

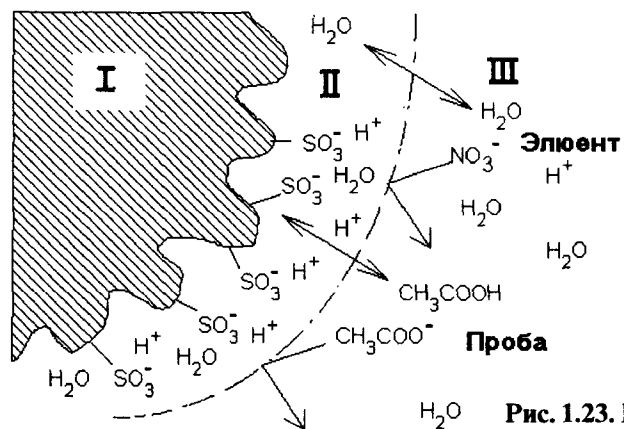


Рис. 1.23. Ионноэкслюзионный механизм разделения

подавляющее большинство сорбентов для ионноэкслюзионной хроматографии сделано на основе сульфированного сополимера стирол – дивинилбензола (СДВБ) с высокой ёмкостью и размером частиц 8 – 15 мкм. Дивинилбензол, являющийся сшивающим реагентом, играет значительную роль в удерживании слабоионизированных компонентов. Меньшая степень сшивки (4%) приводит к более высокому доннановскому проникновению электролитов в смолу и как следствие более медленному элюированию компонента. В то же время более высокая степень сшивки (8%) обеспечивает дополнительную твёрдость полимерной матрицы, благодаря чему удаётся снизить неприятный эффект “разбухания” полимерного сорбента при использовании органического модификатора в элюенте, приводящий к катастрофическому росту обратного давления в хроматографической системе.

Одним из лидеров по производству хроматографических колонок для ионноэкслюзионной хроматографии является компания Phenomenex (США). Колонки марки Rezex ROA (300 x 7.8 мм, степень сшивки – 8%) широко используются на территории РФ для анализа пищевой продукции. Характерными особенностями колонок данного типа являются использование низких линейных скоростей элюирования (0.5 – 0.8 мл/мин) и необходимость избегать использования сильных кислот и оснований, а также органических

растворителей свыше 10% в качестве элюента. В качестве подвижной фазы чаще всего используют разбавленные (0.0025 – 0.005 N) растворы сильных неорганических кислот – серной или фосфорной. Рекомендуемый диапазон pH элюента: 1 – 3. Максимально допустимое давление на колонке – 40 бар.

Несмотря на то, что при помощи ионноэкслюзионной хроматографии можно разделять достаточно широкий спектр органических соединений (аминокислоты, сахара, спирты и фенолы), классической областью применения данного механизма разделения является анализ органических кислот в продуктах питания (безалкогольных напитках, соках, винах, виноматериалах и т.д.). Наиболее сильные и ионизированные кислоты такие как, серная, соляная и азотная, отталкиваются отрицательным зарядом сульфогруппы и элюируются со свободным объёмом колонки. Более слабые кислоты находятся, как правило, в молекулярном виде и не отторгаются смолой. ЗАО “НПКФ Аквилон” (Москва, Россия) совместно с Коломенским ЦСМ был разработан метод определения массовой кон-

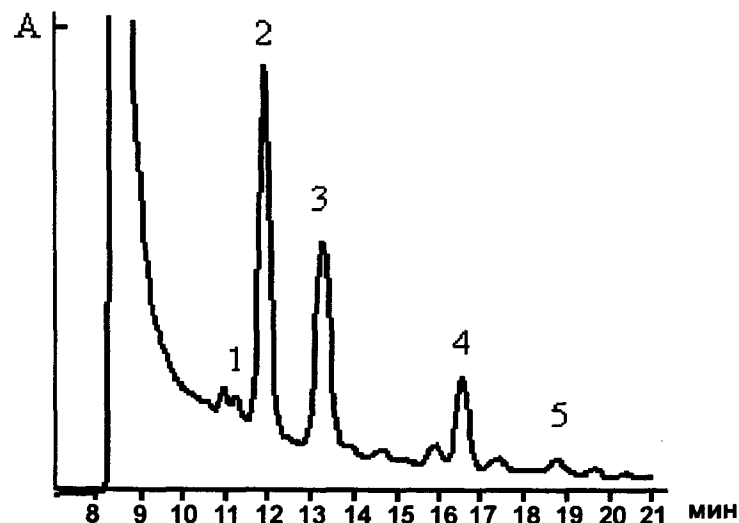


Рис. 1.24. Пример хроматограммы разделения органических кислот в красном столовом вине: 1 – лимонная, 2 – винная, 3 – яблочная, 4 – янтарная + молочная, 5 – уксусная кислота. Элюент – 0.005 N H_2SO_4 , колонка – Rezex ROA (300x7.8мм, 8 мкм), УФ – 230 нм

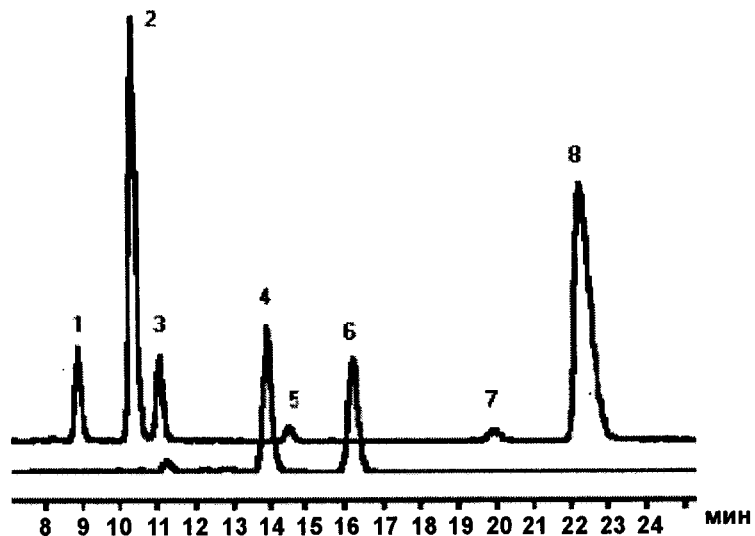


Рис. 1.25. Пример хроматограммы разделения стандартной смеси (1-мальтоза, 2 – глюкоза, 3 – фруктоза, 4 – молочная кислота, 5 – глицерин, уксусная кислота, 7 – метанол, 8 – этанол). Условия разделения: элюент-0,0025 N H₂SO₄, колонка-Rezex ROA (300x7.8мм, 8 мкм), детектирование-УФ 230 нм (компоненты 4 и 6) и рефрактометрическое (1,2,3,5,7,8)

центрации органических кислот (щавелевой, уксусной, лимонной, винной, яблочной, суммы молочной и янтарной) в напитках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (свидетельство ФГУП “ВНИИМС” №9-02 об аттестации МВИ). Пример типовой хроматограммы и условия хроматографирования приведены на рис. 1.24. Ещё одной интересной областью применения ионо-экслюзионной хроматографии является метод контроля ферментативной динамики бражек при производстве спирта, разработанный ЗАО “НПКФ Аквилон”. Метод основан на одновременном ионоэкслюзионном разделении четырёх классов соединений (олигосахариды, моносахариды, органические кислоты, спирты) и их последовательном рефрактометрическом и спектрофотометрическом детектировании. Метод позволяет отслеживать динамику процесса брожения на спиртовых заводах. Пример типовой хроматограммы и условия хроматографирования приведены на рис. 1.25.

1.4.11. Осадочная хроматография

В осадочной хроматографии основным фактором, определяющим разделение и выделение веществ из раствора смеси компонентов, является процесс образования осадков, различающихся растворимостью. Осадочную хроматографию проводят как на бумаге, так и в колонке. В верхней части колонки выделяются осадки веществ, менее растворимых, в нижней части — более растворимых. Смесь, заполняемая колонку, состоит из носителя — высокодисперсного вещества (сорбент) и осадителя — вещества, образующего с исследуемым ионом характерно окрашенное трудно растворимое соединение [30, 192-195].

На возможность образования осадочных хроматограмм указывал еще М. С. Цвет, изучивший образование на фильтровальной бумаге капилляризационных хроматограмм Гоппельсредера. М. С. Цвет показал, что капилляризационные хроматограммы могут возникать вследствие нескольких причин: неодинаковой скорости диффузии, сорбции, коагуляции, изменения растворимости. На примерах хлорофилла им было доказано, что капилляризационная хроматограмма последнего не является сорбционной, а является такой, которая по современным представлениям должна быть причислена к осадочным хроматограммам. М. С. Цвет указал, что при капилляризации спиртового хлорофиллового экстракта спирт, поднимаясь по бумаге, обогащается водой и растворенные в нем пигменты выпадают в осадок в порядке убывающей растворимости их в водном спирте, образуя капилляризационную осадочную хроматограмму.

Разделение веществ в осадочных хроматограммах происходит за счет образования осадков, растворимость которых различна. Анализ основного процесса осадочной хроматографии показывает, что при образовании осадков в колонке возможны два случая: образование осадков в жидкой фазе и образование осадков в результате взаимодействия жидкой и твердой фаз (раствора и сорбента).

Исходя из возможных случаев образования осадков, можно указать два вида осадочных хроматограмм. К первому виду в основном относятся те хроматограммы, которые формируются на колонках, состоящих только из одного компонента, и образование

осадков происходит в жидкой фазе. В качестве такого компонента может быть использовано высокодисперсное, практически нерастворимое в применяемом растворителе вещество, обладающее высокоразвитой поверхностью и не вступающее в химическое взаимодействие с составными частями хроматографируемого раствора. Образование осадков на таких колонках происходит вследствие различных причин: малой растворимости отдельных компонентов смеси, изменения величины pH среды, химического взаимодействия между отдельными компонентами смеси или одного из них с растворителем. Примером таких осадочных хроматограмм является образование зон на колонках, содержащих оксид алюминия. В момент соприкосновения хроматографируемого раствора с оксидом алюминия, имеющим pH 8 – 9, происходит понижение кислотности хроматографируемого раствора, в результате чего из последнего начинают выпадать в осадок малорастворимые гидроксиды, основные соли и окиды Fe^{3+} , Cr^{3+} , Sb^{3+} , As^{3+} , Hg^{2+} и других ионов. Порядок расположения зон в хроматограмме определяется растворимостью соответствующих соединений.

К первому виду осадочных хроматограмм относятся также хроматограммы, образующиеся на колонках, состоящих из веществ, плохо растворимых в применяемых растворителях и дающих с компонентами хроматографируемого раствора малорастворимые осадки. При приливании в колонку хроматографируемого раствора часть осадителя переходит в жидкую фазу за счет действия растворителя и вступает в реакцию с компонентами хроматографируемого раствора. Остальная часть колонки остается в твердом состоянии и играет роль носителя – вещества, задерживающего осадки. Образование подобных осадочных хроматограмм характерно для многих малорастворимых органических реагентов. К этому же виду относятся осадочные хроматограммы, которые формируются на колонках, состоявших из ионообменной смолы, заряженной ионом, способным давать малорастворимые осадки с компонентами элюата. Образование хроматограммы в этом случае может быть представлено следующим образом. В первый момент при соприкосновении раствора с ионообменником происходит обменная реакция между ионами раствора и одноименно заряженными ионами ионо-

обменника, и уже затем перешедшие в раствор из ионообменной смолы ионы реагируют с противоположно заряженными ионами раствора, образуя осадки (образование осадков в жидкой фазе). Ко второму виду осадочных хроматограмм относятся в основном те хроматограммы, которые формируются на колонках, состоящих из двух компонентов: практически нерастворимого в применяемом растворителе высокодисперсного вещества, химически инертного к компонентам элюата, называемого носителем, и вещества, хорошо растворимого в применяемом растворителе и химически взаимодействующего с компонентами хроматографируемого раствора, называемого осадителем. Образование осадков в таких колонках происходит в результате взаимодействия осадителя, нанесенного на носитель, и жидкой фазы. К этому виду осадочных хроматограмм относят хроматограммы, образующиеся на колонках, состоящих из механической смеси носителя и осадителя и представляющих классический вид осадочных хроматограмм. В этом случае образование осадков происходит на поверхности носителя как итог взаимодействия адсорбированных молекул осадителя с ионами раствора в результате проявления ионных или ковалентных сил.

В качестве носителя может быть использовано малорастворимое, высокодисперсное вещество с высокоразвитой поверхностью, обладающее определенным сродством к применяемому осадителю или осадку и химически индифферентное к компонентам хроматографируемого раствора. Для визуального наблюдения осадочных хроматограмм желательно, чтобы носитель имел светлую окраску. В литературе описано применение в качестве носителей силикагеля, крахмала, оксида алюминия, гидроксида алюминия, сернокислого бария, кварца, асбеста, диоксида титана, карбоната кальция, песка, гипса, различных анионитов и катионитов [192-195]. Целесообразность применения того или иного вещества в качестве носителя в каждом отдельном случае диктуется природой хроматографируемых веществ. Во многих случаях, имея набор высокодисперсных, малорастворимых веществ и зная требования, предъявляемые к носителю, можно ориентировочно подобрать последний.

В осадочной хроматографии так же, как и в других видах хроматографического анализа, исключительно большое значение име-

ет зернение носителя. Чем меньше величина зерна носителя, тем полнее происходит взаимодействие осадителя с компонентами хроматографируемого раствора, тем меньше размывание зон на хроматограмме. Поэтому при хроматографических опытах желательно работать с возможно более мелкодисперсными веществами. Ограничение с этой стороны заключается в медленности протекания раствора через мелкодисперсный носитель. Экспериментально установлено, что лучшие результаты по разделению неорганических ионов методом осадочной хроматографии получаются на носителях с величиной зерна 0.1–0.02 мм [195].

Осадителем в осадочной хроматографии может быть вещество, дающее малорастворимые осадки с компонентами хроматографируемого раствора и обладающее способностью задерживаться на применяемом носителе. В качестве осадителей могут применяться как неорганические, так и органические соединения. Последним в настоящее время отдается предпочтение, так как они обладают избирательностью действия и высокой чувствительностью.

При получении осадочных хроматограмм большое значение имеет соотношение носителя и осадителя. Хорошее разделение имеет место при массе осадителя 1–10% от массы носителя.

Техника получения хроматограмм, методики их анализа, физико-химические основы процесса доступно изложены в [195]. При пропускании исследуемого раствора через хроматографическую колонку с сорбентом происходит обмен ионов, входящих в состав сорбента, на ионы хроматографируемого раствора. Последовательная сорбируемость (сорбционный ряд) на хроматографическом оксиде алюминия представлена для некоторых видов ионов в следующем порядке: $\text{Sn}^{2+} > \text{Fe}^{3+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$.

Осадочная хроматография применима при качественном и количественном анализе неорганических веществ, сплавов, разделения и очистки неорганических соединений. В [30, 192–195] приведены рутинные методики определения содержания меди, олова, свинца, цинка и некоторых других тяжелых металлов в растворах биологических объектов методом осадочной хроматографии. Медь осаждают рубеоноводородной кислотой, олово – этилксантогенатом калия, свинец – родизонатом натрия, цинк – тетрароданомер-

куратором аммония в присутствии соли кобальта, железо – ферроцианидом калия, никель – диметилглиоксимом.

1.4.12. Гидродинамическая хроматография

Гидродинамическая хроматография (ГДХ) – жидкостная хроматография, в которой роль неподвижной фазы играют стенки колонки (канала) и разделение смеси макромолекул или частиц размером от нескольких десятков нанометров до нескольких микрометров происходит вследствие различия скоростей протекания подвижной фазы вдоль оси канала и у его стенок, а также за счет распределения разделяемых частиц по сечению канала в соответствии с их размером [196]. Колонка заполняется твердыми непористыми сферическими частицами из стекла, пластика или ионообменной смолы размером от 10 до 50 мкм в зависимости от эффективности колонки. Вместо колонки может применяться полый капилляр. В последнем случае говорят о капиллярном варианте ГДХ. Для целей ГДХ может быть использован типовой жидкостной хроматограф. Возможно, первым исследователем, наблюдавшим сегрегацию частиц в капилляре, был Пуазейль, который заметил наличие возле стенки трубки области, свободной от частиц красителя. Разработал метод ГДХ Смолл в 1974 г. [196]. К своему открытию Смолл пришел в опытах, в которых он пытался распространить методику эксклюзионной хроматографии на определение размеров коллоидных частиц на уровне 1–2 мкм. Из-за чрезвычайно медленной броуновской диффузии таких частиц в жидкости их массообмен в пористой среде затруднен, что приводило к интенсивному размыванию пиков и низкому разрешению. Как альтернатива гель-хроматографического варианта по аналогии с сорбционно-десорбционным механизмом разделения компонентов на молекулярном уровне был предложен гипотетический механизм разделения коллоидов на основе процессов флокуляции — дефлокуляции. Велся поиск условий для реализации такого механизма. В опытах по разделению частиц полистирольного латекса на слое катионита в потоке деионизованной воды при очень низком разрешении был обнаружен необычный эффект. Частицы большего размера элюировали перед частицами меньшего размера, что противоречило предполагаемому

механизму флокуляции – дефлокуляции. Кроме того, выбранные хроматографические условия, особенно низкая ионная сила подвижной фазы, вообще не способствовали процессу флокуляции. Проведенные оценки исключали возможность эксклюзии по размерам в слое катионита. Для объяснения наблюдаемых эффектов была привлечена капиллярная модель, согласно которой свободное пространство между заполняющими колонну непористыми частицами рассматривается как система капилляров. Известно, что для вязкой жидкости, текущей в капилляре, существует параболический профиль скорости с максимумом по оси капилляра (поток Пуазейля). Коллоидная сферическая частица (рис. 1.26.), введенная в цилиндрический канал, благодаря броуновскому движению будет совершать радиальные перемещения, перпендикулярные направлению потока, так что ее продольная составляющая скорости соответствует локальной скорости потока. Средняя скорость коллоидной частицы поэтому будет отражать профиль скорости жидкости в капилляре за одним важным ограничением. Центр частицы из-за ее конечных геометрических размеров не будет достигать прилегающих к стенкам капилляра и имеющих наименьшую скорость слоев. Следовательно, частица будет двигаться через капилляр со средней скоростью, превышающей среднюю скорость жидкости на фактор, который возрастает с увеличением отношения размера частицы к радиусу капилляра. Чем крупнее частица,

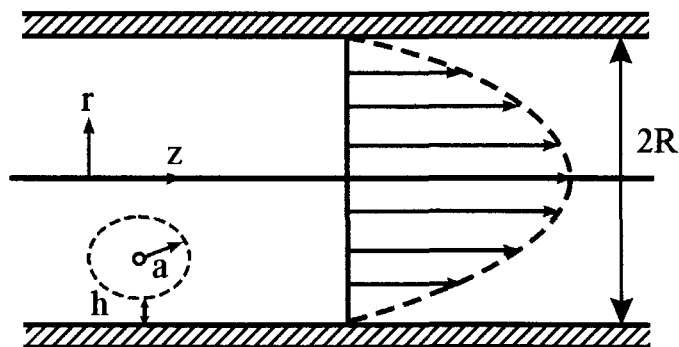


Рис. 1.26. Схема движения сферической коллоидной частицы в потоке Пуазейля в цилиндрическом капилляре [196]. R и a – радиусы капилляра и частицы, r и z – радиальная и линейная координаты частицы, h – расстояние от сферической поверхности частицы до стенки капилляра

тем большее время (по сравнению с частицами меньшего размера), в процессе движения по капилляру она находится в слоях с большей скоростью несущей жидкости. Это обуславливает различие в средних скоростях переноса частиц разного размера и обеспечивает при достаточной длине канала их разделение. Из сказанного становится понятным, что более крупные частицы выходят из колонки первыми, а самые мелкие остаются “в хвосте”.

Разделение в ГДХ характеризуют величиной

$$R_f = u_p / u_m \quad (1.34)$$

где u_p – скорость переноса коллоида, u_m – средняя скорость элюента. Последнюю оценивают по времени удерживания движущегося со средней скоростью жидкости подходящего маркера, при выборе которого необходимо, чтобы он перемещался по слою лишь в свободном объеме насадки и по своим свойствам мало отличался от элюента. Следует подчеркнуть, что обычно $R_f > 1$, т. е. скорость коллоидных частиц превышает среднюю скорость несущей их жидкости. Это необычное явление находится в полном противоречии с общеизвестными хроматографическими закономерностями, согласно которым и только в предельном случае для несорбирующихся компонентов, $R_f = 1$.

Рассматриваемый вариант хроматографии был назван гидродинамическим потому, что первым его исследователям поначалу казалось, что в отличие от обычных вариантов хроматографии, в основе которых лежат определенные физико-химические взаимодействия между сорбатом и неподвижной фазой, в этом методе силы, ответственные за разделение, определяются факторами, действующими исключительно в свободном объеме слоя насадки. Точнее в пространстве между зернами, доступном для гидродинамического потока, без учета внутренней пористости элементов слоя. Однако последующие экспериментальные и теоретические исследования показали, что гидродинамика потока – всего лишь один из факторов, определяющих R_f , и механизм взаимодействия имеет гораздо более сложный характер. Например, на процесс разделения влияет потенциал взаимодействия коллоидных частиц со стенками капилляра. Наиболее общий характер носят дисперсионные взаимодействия Лондона – Ван-дер-Ваальса и электростатические взаимодействия двойных электрических слоев. Теория гидродинамической хроматографии проанализирована в работе.

Еще одной особенностью ГДХ является то, что хроматографируемые частицы в большинстве случаев практически нерастворимы в подвижной фазе. Они находятся в виде суспензии, причем размер частиц может быть достаточным для наблюдения за ними с помощью микроскопа. Это так же противоречит одному из главных правил жидкостной хроматографии, согласно которому для успешного проведения хроматографического процесса разделяемые вещества должны быть полностью растворимы в подвижной фазе.

В качестве детектора в ГДХ обычно используют *турбидиметр*. В зависимости от длины волны детектор работает либо по механизму, сочетающему рассеяние с химической абсорбцией, либо только – рассеяния света. Для коллоидов с очень малыми частицами (малыми по отношению к длине волны света λ) мутность пропорциональна шестой степени диаметра частиц d , для более крупных частиц эта зависимость менее резкая. Как следствие сигнал от малых частиц сравнительно слабый, хотя он может быть увеличен за счет использования более коротковолнового источника. Следует отметить, что при измерениях распределений частиц по размерам больший интерес представляет не абсолютный, а относительный сигнал. Для неабсорбирующих частиц изменения λ или отношения коэффициентов преломления коллоида и среды слабо влияют на относительные показания детектора. При абсорбции относительный сигнал возрастает благодаря значительному усилению коэффициентов поглощения малых частиц. Кроме измерения мутности полимерной суспензии, фотометр должен давать информацию об оптической плотности зоны элюирования молекулярных маркеров, по которой рассчитывают среднюю скорость несущей жидкости. Оптическая плотность направляемого из колонки в детектор потока не должна превышать некоторого предела, чтобы обеспечить согласно закону Бера линейность зависимости оптическая плотности от концентрации частиц. Зависимость поглощения и рассеяния света коллоидной суспензией как от размера частиц, так и от их концентрации, усложняет интерпретацию результатов. В ряде случаев зависимостью от d_p пренебрегают.

Помимо турбидиметра в ГДХ, получил распространение дифференциальный рефрактометрический детектор. По сравнению с тур-

бодиметрией неабсорбирующих частиц показания дифференциального рефрактометра существенно меньше зависят от размера частиц.

При уменьшении среднего размера частиц насадки величина R_f возрастает, т. е. разрешение улучшается. Зависит R_f не только от размера разделяемых частиц и размера частиц насадки, но и от ионной силы подвижной фазы. Увеличение ионной силы во всех случаях приводит к уменьшению R_f . Это связано с электростатическими взаимодействиями двойных электрических слоев поверхности частиц насадки и коллоидных частиц. Что касается влияния скорости подвижной фазы, то с ее повышением величина R_f сначала уменьшается, а при достижении минимума (при рабочем давлении около 8 МПа) либо остается постоянной, либо возрастает.

Капиллярная гидродинамическая хроматография реализуется в капиллярах с внутренним диаметром 75 – 800 мкм при скорости потока подвижной фазы 0.2–20 мкл/мин. Если гель-хроматография применяется при разделении на молекулярном уровне с М до нескольких млн. дальтон, область использования ГДХ с набивными колонками – частицы с размером 0.01–1.0 мкм, то капиллярный вариант ГДХ позволяет разделять коллоидные частицы размером 0.5 – 30 мкм. Для реализации капиллярной ГДХ можно применять стандартные хроматографы, например, фирмы “Hewlett-Packard” серии HP 1100. Этот хроматограф может быть легко трансформирован в систему для высокоэффективной капиллярной ЖХ с помощью процессора микропотока установленного перед колонкой. Стандартные исходные скорости потока устанавливаются равными 100 мкл/мин и при разделении потока понижаются до 2–4 мкл/мин – величин скорости потока, оптимальных для капиллярных колонок с внутренним диаметром 300 мкм. Преимуществом такого подхода является то, что для выполнения разделений методом капиллярной ГДХ можно использовать стандартную хроматографическую систему.

Метод ГДХ, как и гель-хроматография, позволяет анализировать полидисперсные системы. Развитие методов калибровки и численных методов расчета на компьютере позволяют получать кривые распределения частиц по размерам даже в случае неразделенных пиков. ГДХ, как экспрессный и не деструктивный метод анализа частиц по размерам, позволяет исследовать кинетику процес-

сов, в ходе которых частицы меняют свой эффективный гидродинамический диаметр, в частности процессов усадки полимерных частиц, набухания, агрегации.

1.4.13. Фракционирование в поперечном поле сил

Фракционирование в потоке, находящемся в поперечном физическом поле (Fild-Flow Fractionation) – жидкостная хроматография, в которой роль неподвижной фазы играют стенки колонки (канала) и разделение смеси макромолекул или частиц происходит вследствие различия скоростей протекания подвижной фазы вдоль оси канала и у его стенок, а также за счет распределения разделяемых частиц по сечению канала в соответствии с их размерами и поведением в приложенном в поперечном направлении поле (гравитационном, магнитном, температурном). Фракционирование в потоке под действием силовых полей (FFF) методологически можно рассматривать как однофазовую жидкостную хроматографию. Силовое внешнее поле, или градиент в одной фазе, заменяет собой силы разделения и адсорбции и распределяет растворенное вещество между различными областями потока. Имея дело с одной фазой, можно полностью исключить искажения в распределении фаз и межфазовую адсорбцию, которые неизбежно возникают во всех видах хроматографии при увеличении молекулярной массы. Разделение методом FFF применяются для анализа полимеров, биополимеров (белков, липопротеинов, белковых агрегатов) и даже для частиц (взвесей, микроорганизмов, микрогелей в полимерных матрицах). В настоящее время исследован диапазон от 10^3 до 10^{12} дальтон [197-203].

Разделение происходит на основе использования внешнего поля или градиента для избирательного распределения растворенного вещества между различными областями потока в канале. Канал обычно не имеет наполнителя, имеет равномерное сечение, характеристики его легко рассчитываются теоретически. На рис. 1.27 показана наиболее предпочтительная конфигурация канала.

Теоретические основы метода FFF изложены в [197]. Практически в ходе эксперимента канал работает так же, как колонка в процессе жидкостной хроматографии: насос создает поток и управляет

им, образец вводится в начало канала, детектор контролирует элюируемую жидкость. Только природа канала отличается от колонки и механизм разделения совершенно другой. В сущности, канал представляет собой хроматографическую колонку, которая содержит лишь подвижную фазу. В этом способе разделения внешнее поле играет ту же роль, что и стационарная фаза. Действуя перпендикулярно потоку, оно вытесняет растворенное вещество в относительно медленные области потока недалеко от одной из стенок канала.

Эти квазинеподвижные области около стенок канала играют ту же роль, что и неподвижная фаза в классической хроматографии, а поля, которые управляют ими, аналогичны силам притяжения, которые создаются стационарной фазой.

Теоретически разделение в поле сил имеет столько же разновидностей, сколько их имеет хроматография. Большинство основных разновидностей определяется видами “полей”, которые используются для создания удерживания в силовом поле разделения. Эти поля аналогичны видами стационарных фаз в хроматографии. В хроматографии в качестве стационарных фаз применяются жид-

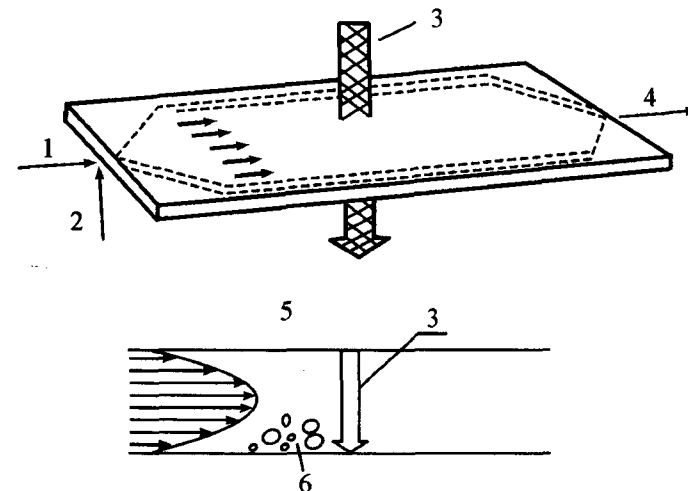


Рис. 1.27. Форма канала с параллельными стенками для разделения в потоке под действием поперечного поля: 1 – поток растворителя, 2 – введение образца; 3 – вектор поля, 4 – к детектору; 5 – параболический профиль потока; 6 – растворенное вещество

кости, твердые поверхности, ионообменные смолы, пористые материалы, жидкие кристаллы и т.д. Аналогично в качестве силовых полей можно использовать тепловые градиенты, электрические поля, поля поперечного потока, гравитационные поля.

Таким образом, ясно, что разделение в поле сил так же, как и хроматография, является универсальным методом, который может быть использован для работы с водными, неполярными и полярными органическими растворителями, с молекулами произвольной структуры и с частицами, а также с веществами, молекулярная масса которых меняется в очень больших пределах.

Теоретическая тарелка в методе FFF определяется по формуле:

$$N = \chi \omega^2 v / D, \quad (1.35)$$

где v – средняя скорость потока в канале; χ – коэффициент, связанный с длиной и шириной канала сложной зависимостью; D – коэффициент диффузии растворенного вещества в растворителе; ω – ширина канала.

Калибровочная зависимость для однофазовой хроматографии имеет:

$$\bullet \quad V_R/V_0 = \omega M^q, \quad (1.36)$$

где коэффициент q может принимать значения от 1/3 до 1.

Из формулы (1.36) видно, что эта зависимость позволяет согласовать требования к широкому диапазону и хорошей разрешающей способности. На рис. 1.28. приведен пример применения метода FFF для разделения полистирольных полимеров, который подтверждает возможность получения очень широкого диапазона, но отнюдь не говорит о том, что этот диапазон является максимально возможным. Для разделения использовали тепловое поле. Подвижная фаза – вода. Разделение проводили в течение одного цикла, процесс программировался. При этом использовали канал длиной 0,4 м и шириной 0,02 м, образованный двумя пластинами, расстояние между которыми составляло $25 \cdot 10^{-5}$ м. Одна металлическая пластина нагревалась, другая – охлаждалась. В качестве силового поля служил температурный градиент, создающий тепловую диффузию. Программирование процесса заключалось в постепенном понижении температуры нагреваемой пластины.

Запись кривых распределения вещества при разделении в поле сил напоминает хроматограмму из гель-хроматографии, вместе с

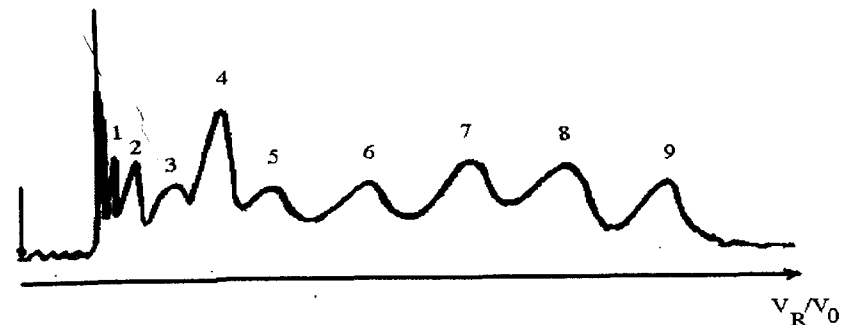


Рис. 1.28. Разделение полистиролов методом FFF. 1 – 4000; 2 – 20000; 3 – 51000; 4 – 97000; 5 – 200000; 6 – 411000; 7 – 860000; 8 – 1800000; 9 – 7100000 дальтон

тем особые однофазовые характеристики и иные силы, управляющие разделением, создают коренные отличия в способе перемещения и разделения растворенных веществ.

Понимание этих отличий очень важно для уяснения недостатков и преимуществ данного способа разделения, а также для определения возможности расширения диапазона молекулярных масс до очень больших величин. Поэтому уместно рассмотреть особенности метода FFF. Площади поверхности для разделения в поле сил много меньше, чем для хроматографии. Причина заключается в том, что эта поверхность ограничена стенками канала. Более того, материал этой поверхности легко контролировать и заменять. Основным требованием к материалу канала является способность передавать воздействие поля. Обычно этому требованию удовлетворяет широкий круг материалов. Следующая особенность однофазовой хроматографии состоит в том, что при разделении под действием силового поля возможно довольно точное описание удерживания в этой системе, что позволяет заранее выбрать оптимальные условия работы. Что еще более важно, можно предварительно дать приблизительную оценку характеристикам сложной системы, не прибегая к снятию калибровочной кривой. Вещества в каждой точке спектра элюции можно непосредственно охарактеризовать с помощью некоторых физико-химических параметров, таких, как диффузия, или с помощью ряда простых физико-хими-

ческих параметров. Эти параметры могут быть, в свою очередь, связаны с молекулярной массой, распределением заряда и с другими важными свойствами растворенного вещества.

Почти линейная зависимость между объемом удерживания и молекулярной массой обеспечивает достаточно широкий диапазон измерений по молекулярной массе при достаточно хорошем разделении. Это обстоятельство объясняется линейным возрастанием скорости потока с ростом расстояния от стенки к центру канала, а также обратной зависимостью от молекулярной массы.

Открытый и однородный канал, распределение потока в пределах относительно большого поперечного сечения, отсутствие стационарной фазы, которая разворачивает сегменты макромолекул против потока, – все эти факторы позволяют в однофазовой хроматографии избежать деструкции макромолекул при движении вдоль канала вплоть до очень высоких значений молекулярных масс. Простым изменением величины силового поля можно получить величину объема удерживания практически в разумных пределах любой желаемой величины. Такой контроль является очень быстрым и может быть осуществлен, если потребуется, непосредственно в ходе процесса. При таком виде контроля над процессом разделения можно раздвинуть пики, слишком близко сгруппированные, улучшив тем самым их разрешение. Кроме того, путем простого снижения силы поля можно более быстро элюировать пики с очень большим временем удерживания. Другим полезным качеством такого контроля является способность полностью прекратить удерживание. Благодаря этому, полностью отпадает необходимость в такой операции, обычной в гель-хроматографии, как длительная промывка колонки с целью удаления компонентов “забивших” колонку. В однофазовой хроматографии, если надо удалить из колонки остаток, нужно просто уменьшить воздействие силового поля до нуля и дождаться прохождения через канал объема, немного большего, чем свободный объем. Силу внешнего поля в однофазовой хроматографии можно непрерывно варьировать в соответствии с любой программой. Наибольшее преимущество состоит в том, что программу можно использовать для расширения диапазона молекулярных масс. Так, если сила поля непрерывно

уменьшается в течение цикла, то первыми вымываются макромолекулы или частицы с низкими молекулярными массами, за ними, по мере уменьшения поля, компоненты с более высокими молекулярными массами. Степень избирательности воздействия силового поля на разделение вещества в однофазовой хроматографии пока не определена. Несомненно, что химические свойства разделяемых макромолекул или частиц будут оказывать влияние на разделение при воздействии некоторых видов полей. Важность этого эффекта требует дальнейших исследований.

По мере развития новой аналитической техники и технологии метод FFF находит все большее применение в биохимии, микробиологии и химии полимеров.

Одним из перспективных направлений FFF является проточное фракционирование с асимметричным электроосмотическим потоком. Этот метод позволяет фракционировать объекты в диапазоне от 1 нм до 100 мкм. Он превосходит по разрешающей способности проточное фракционирование в пузелейевском потоке на порядок. Проточное фракционирование в асимметричном электроосмотическом потоке предложено В.П. Андреевым [201-203]. В отличие от классического проточного фракционирования в этом методе продольный поток – электроосмотический, причем неоднородность профиля потока, необходимая для реализации метода, достигается за счет изготовления стенок канала из материалов, имеющих отличающиеся значения дзета-потенциалов. В частности, если дзета-потенциал одной из стенок канала равен нулю, то в канале будет сформирован электроосмотический поток с линейным профилем; при неравных, но имеющих один знак дзета-потенциалах стенок реализуется трапецевидный профиль, при отличии в знаках дзета-потенциалов стенок реализуется ситуация, когда жидкость движется в одном направлении у одной из стенок и в противоположном направлении у другой стенки. Вариант с движением жидкости в противоположных направлениях у нижней и верхней стенок канала интересен для одновременного фракционирования частиц по плотностям и размерам. Математическое моделирование процесса проточного фракционирования в канале с асимметричным электроосмотическим потоком подтвердила высокую эффективность

и разрешающую способность метода. В частности, при определенном сочетании возникающего в канале линейного асимметричного электроосмотического и пуазейлевского потоков достигается рекордная разрешающая способность, превышающая разрешающую способность классического FFF на 2 порядка.

1.4.14. Электрофорез

Электрофорез – электромиграционный метод разделения, смежный с жидкостной хроматографией. Процесс разделения компонентов смеси происходит в жидком растворе электролита, т.е. жидкость является неизменным и важным компонентом электрофоретической системы. Растворитель (буферный раствор) представляет собой неподвижную фазу, тогда как растворенное вещество (заряженные частицы) мигрируют под действием приложенного электрического поля. Имеются гибридные электрохроматографические методы, в которых разделение происходит и за счет хроматографического процесса, и под влиянием внешнего электрического поля. Например, незаряженные молекулы можно разделять с помощью *мицеллярной электрокинетической хроматографии* [204-206]. В этом случае к буферу добавляется детергент, и нейтральные молекулы распределяются между буфером и мицеллами в соответствии с их гидрофобностью. Разделение в этом методе основано на подвижности мицелл, заряженных в большинстве случаев отрицательно. Поскольку в основе разделения лежит процесс распределения в жидкофазной среде, можно с полным основанием отнести этот метод к жидкостной хроматографии. В целом методы, в которых имеется неподвижная фаза для ЖХ, а течение элюента и перенос пробы происходит только за счет электроосмотического потока, относят к *электрохроматографии*. В *электрохроматографии* зонный электрофорез чаще всего сочетается с ионообменной хроматографией.

Электрофорез основан на свойстве ионизированных частиц к электрофоретической подвижности в постоянном электрическом поле. Теория миграции ионов в условиях электрофореза рассмотрена в [58,204-205]. Скорость иона определяется в первую очередь его зарядом, размером, напряженностью поля и вязкостью среды. На-

пряженность поля E тем больше, чем больше плотность тока j , меньше площадь сечения электрофоретической ячейки q и электропроводность χ . Если напряженность поля можно выразить формулой

$$E = j/q\chi, \quad (1.37)$$

то скорость идеальной сферической частицы определяется соотношением

$$v = zE/6\pi\eta, \quad (1.38)$$

где z – заряд частицы, E – напряженность электрического поля, r – радиус частицы, η – вязкость среды.

Электрофоретическая подвижность имеет размерность $\text{см}^2/(\text{В}\cdot\text{с})$ и определяется соотношением

$$u = v/E. \quad (1.39)$$

Вместе с тем приведенные выше уравнения справедливы при бесконечном разбавлении, отсутствии солей и идеальной сферической структуры частицы. В реальных условиях с повышением ионной силы снижается подвижность ионов из-за накапливания ионов противоположного знака, что приводит к снижению эффективного заряда. Безусловно, имеются отклонения в электрофоретической подвижности, связанные с не сфероидальным строением частиц. Величина u обратно пропорциональна η неподвижной фазы. Вязкость уменьшается с увеличением температуры, а подвижность возрастает в 2.5-3 раза с повышением температуры на каждый градус. Понизить подвижность частицы можно, поместив жидкую среду в твердый носитель с волокнистой структурой или порошкообразный носитель в гель. В этих случаях путь частицы удлинится, уменьшается напряженность поля.

Классический вид электрофореза – *метод подвижной границы* по Тизелиусу, дает точную информацию об электрофоретической подвижности биополимеров (белков, пептидов), но не пригоден из-за низкого разрешения для выделения чистых компонентов анализируемой смеси. Так, если подвижность компонентов уменьшается в ряду A, B, C, D , то в результате электрофореза появляется зона, обогащенная компонентом A , за ней следуют зоны смесей $A+B$, $A+B+C$, $A+B+C+D$, $B+C+D$, $C+D$ и, наконец, зона самого медленного компонента D .

При разделении методом *зонного электрофореза* перемещение компонентов смеси продолжается до полного их разделения. В этом

методе используют неподвижный носитель, по поверхности или через объем которого осуществляется миграция ионов. Носители могут иметь вид полос (например, из бумаги, колонок, дисков, тонких слоев и др.). При проведении электромиграционных процессов важно, чтобы у концентрационных зон были четкие границы. Диффузию можно ограничивать при помощи градиента плотности, вращения, камер с извилистыми каналами, капиллярного эффекта, ламинарного потока, возрастающей вязкости, если среда жидкая. В пористой среде антиконвекционную стабилизацию зон обеспечивают применением различных типов носителей с волокнистой структурой (разнообразные виды бумаги), гомогенных пленок на основе модифицированной целлюлозы, незакрепленных слоев с молекулярно-ситовыми свойствами (целлюлоза, крахмал, гранулированные гели). Кроме того, процессы проводят в различных гелях (гель-электрофорез) на основе крахмала, агарозы, полиамидов. Электрофорез реализуют под действием полей *низкого* (<1000 В) и *высокого напряжения* (1000-10000 В). Высоковольтный электрофорез проводят, как правило, на бумаге. Этот метод дает хорошие результаты при анализе аминокислот и других небольших молекул и непригоден для анализа макромолекул. Обнаружение разделенных компонентов на электрофоретической диаграмме выполняют, погружая в раствор со специфичным реагентом или опрыскивая бумагу этим реагентом.

При разделении белков и пептидов продуктивен метод *изоэлектрофокусирования*. Разделение смеси проводят в среде, представляющей собой смесь амфотерных соединений, образующих устойчивый градиент pH в постоянном электрическом поле. Соединения с различными изоэлектрическими точками мигрируют до такого положения, в котором pH равен их изоэлектрическим точкам. Устанавливается квазистационарное состояние, миграция соединений прекращается, диффузия компенсируется фокусирующим влиянием электрического поля при градиенте pH. Гипотетическая смесь компонентов A, B, C и D в этом случае расположится между низкомолекулярными амфотерными соединениями M_1 ; M_2 , A, M_3 , B, M_4 , C, M_5 , D, M_6 . Где M_i – добавленные промежуточные фракции с различными изоэлектрическими точками.

В *изотахофорезе* используют два электролита – лидирующий электролит, который содержит ион с максимальной электрофоретической подвижностью, и концевой электролит, содержащий ион с минимальной подвижностью по сравнению с подвижностью ионов анализируемой смеси A, B, C и D. Под воздействием электрического поля смесь разделяется на примыкающие друг к другу зоны индивидуальных компонентов, выходящих в порядке понижения их электрофоретической подвижности: лидирующий ион, A, B, C, D, концевой ион. Возможность регулирования концентраций в исследуемых зонах за счет изменения свойств лидирующего электролита и равномерность концентрации данного компонента внутри каждой зоны делает этот метод особенно ценным для качественного и количественного анализа и препаративного разделения [58].

В *гель-электрофорезе* смесь заряженных макромолекул разделяется в результате различия в их заряде, размере и скорости миграции через гель, помещенный в электрическое поле. При этом на электрофоретическую миграцию молекул оказывает влияние матрица геля и, поэтому достигается селективное разделение молекул по размерам. Гели на основе крахмала, агарозы или силикагеля используют в первую очередь для стабилизации зон. Макропористые гели, особенно гели агара и агарозы, наиболее широко применяют в методе *иммуноэлектрофореза*. Особенностью этого метода является обработка смеси белков раствором антисыворотки после проведения электрофоретического разделения. Антисыворотка содержит в себе специфические антитела, воздействующие на индивидуальные компоненты смеси белков. Антигены и антитела, взаимодействуя между собой, оседают, образуя линии осаждения, каждая из которых должна соответствовать определенному белку. Иммуноэлектрофорез позволяет проводить идентификацию белков серологическими и физико-химическими методами. Путем введения радиоактивной метки в антигены можно существенно повысить чувствительность метода. Эта разновидность электрофореза получила название *радиоиммуноэлектрофореза* [80]. Полиакриламидный гель химически весьма инертен. Его слабое сродство к красителям позволяет быстро обнаруживать биополимеры (белки, нуклеиновые кислоты) по цветным реакциям. Характерен метод электрофореза в градиен-

те плотности полиакриламидного геля. На первом этапе осуществляют зонный электрофорез, в заключение – молекулярно-ситовое разделение. Движение веществ от старта постепенно тормозится вследствие уменьшения пор геля. Ограничение подвижности, вызываемое гелем, приводит к фокусированию зон.

1.4.15. Капиллярный электрофорез

Одним из самых современных и перспективных сепарационных методов на сегодняшний день является *капиллярный электрофорез*, вобравший в себя все лучшие качества хроматографических методов и электрофореза. Развитие этого метода началось в конце 70-х, начале 80-х годов прошлого века с работ Миккерса, Эвериртса, Йоргенсона и Лукаса [207-234]. В этом методе разделение смеси заряженных или нейтральных молекул основано на различии в их электрофоретической подвижности и (или) распределении между раствором и движущимися в электрическом поле заряженными частицами (мицеллами, коллоидными частицами, металлокомплексами, молекулами полиэлектролита). При анализе методом капиллярного электрофореза пробу небольшого объема (несколько нанолитров) вводят на анодном конце в кварцевый капилляр, заполненный ведущим электролитом (например, фосфатные и боратные буферные растворы с концентрациями 10-100 мМ, растворы органических и неорганических солей, кислот и оснований). К тонкому кварцевому капилляру (внутренний диаметр 25-100 мкм) длиной 20-100 см прикладывают напряжение от 10 до 30 кВ. Под действием электрического поля компоненты пробы начинают двигаться по капилляру с разной скоростью, зависящей от их структуры, заряда и молекулярной массы, и соответственно, в разное время достигают детектора. Разделение пробы достигается приложением напряжения к буферным сосудам, на электрофоретическое перемещение всегда накладывается более или менее интенсивный электроосмотический поток, способствующий пассивной транспортировке зоны пробы, а не ее разделению. Этот эффект сильно зависит от рН буфера и от свойств поверхности капилляра. Он может быть настолько большим, что будут двигаться не только нейтральные молекулы, но даже отрицательно заря-

женные ионы, которые могут перемещаться к детектору, несмотря на их электрофоретическую миграцию. На поверхности кварцевого капилляра из-за диссоциации силанольных групп образуются в процессе электрофореза отрицательные заряды, вблизи стенок индуцируются положительные заряды, и электроосмотический поток будет направлен к катоду. Это обуславливает расположение детектора вблизи катодного пространства. Благодаря электроосмотическому потоку к катоду все незаряженные молекулы перемещаются с одинаковой скоростью и не могут быть разделены, в то время как разделение заряженных ионов возможно благодаря их различной электрофоретической подвижности. Электроосмотический поток можно регулировать с помощью химического модифицирования поверхности капилляра, при этом одновременно уменьшается возможная адсорбция компонентов пробы на поверхности капилляра и улучшается воспроизводимость анализа. В качестве покрытий используются алкилсилановые, фторалкильные, гидрофильные полиэфирные, полиакриламидные и другие покрытия.

Детектирование компонентов пробы может осуществляться спектрофотометрическим, кондуктометрическим, рефрактометрическим, спектрофлуориметрическим или масс-спектрометрическим детектором. Детектор расположен ближе к катодному концу капилляра. Капилляр принудительно охлаждается. Способ ввода пробы – гидродинамический (созданием давления в сосуде для пробы или созданием вакуума в катодном буферном резервуаре) или за счет электрофоретической миграции пробы в капилляр в результате приложения соответствующего электрического напряжения к концам капилляра. Так, в системе капиллярного электрофореза “Капель-103” ввод пробы осуществляют гидродинамически при 900 мбар”с [206]. На рис. 1.29. представлена схема аппарата для капиллярного электрофореза. Полученная электрофореграмма представляет собой последовательность пиков, по которым, как и в хроматограмме, можно идентифицировать и количественно определить конкретное соединение. Воспроизводимость времен удерживания – 5%. Среднее квадратическое отклонение выходного сигнала по высоте пика – 5%. Пределы обнаружения веществ 0.2 – 1.0 мг/дм³. Обработка результатов проводится с помощью типовых хроматографических программ.

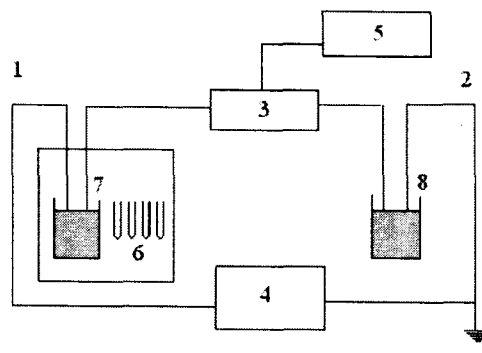


Рис. 1.29. Принципиальная схема капиллярного электрофоризера: 1 – анодная зона, вход капилляра; 2 – катодная зона, выход капилляра; 3 – детектор; 4 – источник высокого напряжения; 5 – регистрирующее устройство; 6 – контейнеры для проб; 7, 8 – сосуды с буферным раствором [234]

Капиллярный электрофорез обеспечивает очень высокую эффективность разделения (число теоретических тарелок достигает 2.000.000), поэтому метод широко применяется не только для выявления близких по строению веществ (белков, пептидов, аминокислот, витаминов, наркотиков, красителей, ионов токсичных металлов, анионов), но и для контроля качества, технологического контроля и идентификации лекарственных препаратов и пищевых продуктов, анализе гербицидов, пестицидов, нитрозаминов, при клинических анализах, в криминалистике и судебной экспертизе [211-241]. При этом не требуется прецизионных насосов высокого давления, необходимых для жидкостной хроматографии, несравнимо меньше расход высокочистых растворителей. Отсутствие твердого сорбента в капилляре исключает возможность его “старения”, химической и физической деструкции и любого неспецифического связывания с ним компонентов пробы. Капиллярный электрофорез легко автоматизируется, аппаратура компактней и проще конструктивно, чем в случае ВЭЖХ. Метод имеет не только превосходную разрешающую способность, но и быстрое время анализа. К недостаткам метода можно отнести невозможность анализа с его помощью газообразных соединений и веществ, нерастворимых в воде и водно-органических смесях. Кроме того, к сожалению, на практике во многих случаях данный метод обладает заметно худшей воспроизводимостью по сравнению с классическими хроматографическими методами.

Высокоэффективный капиллярный электрофорез является альтернативным решением миниатюризации жидкостного сепараци-

онного анализа. В этом методе, благодаря прямоугольному фронту скорости при электроосмотическом и электрофоретическом движении в капилляре, нанометровых размерах мицелл при электрокинетической хроматографии, размывание концентрационных зон определяется только молекулярной диффузией. Отсюда эффективность разделения, измеряемая в миллионах теоретических тарелок на 1 м. В настоящее время разработаны сверхчувствительные лазер-индуцированные флуоресцентные детекторы, прекрасно сочетающиеся с капиллярным электрофорезом ввиду соизмеримости диаметра лазерного луча и кварцевого капилляра. Это позволяет использовать метод для анализа предельно малых количеств вещества. В частности, это особенно хорошо проявляется при сравнительном анализе следовых количеств ионов в водных растворах. Дальнейший прогресс в области капиллярного электрофореза связан с микрофлюидными аналитическими системами, представляющими чип-реализацию высокоэффективного капиллярного электрофореза. Это одно- и многоканальные электрофоретические чип-анализаторы с прямоугольными капиллярами, изготавливаемые с помощью техники параллельной фотолитографии или микролития в прецизионных формах. По методикам анализа и объектам исследования чип-анализаторы соответствуют типовым капиллярным электрофоризерам, отличаясь от них значительно меньшей стоимостью. В [207-233] детально изложены современные теоретические и практические аспекты применения капиллярного электрофореза и других электромиграционных методов, описаны эксперимент и аппаратура, составы буферов и условия анализа разных классов соединений.

1.5. Колоночная жидкостная хроматография

В *колоночной жидкостной хроматографии* процессы разделения смеси веществ осуществляются в цилиндрическом слое сорбента, называемом *колоной*. В зависимости от размера (диаметра и длины) колонки, а также от размера частиц и способа упаковки сорбента в колонке различают *низкоэффективную* и *высокоэффективную жидкостную хроматографию*. Низкоэффективная колоночная хроматография – это классический вариант жидкостной хроматографии, предло-

женный М.С. Цветом, в котором стеклянная колонка диаметром от нескольких миллиметров до нескольких сантиметров и длиной до нескольких десятков сантиметров заполнена в лабораторных условиях сорбентом с размером частиц более 10 мкм или гелем с крупными порами. В настоящее время она применяется, прежде всего, в препаративных целях. Подвижная фаза подается в верхнюю часть колонки небольшими порциями вручную, самотеком из склянки с нижним тубусом, снабженным краном, или перистальтическим насосом. Колонку наполняют сорбентом, внизу которого помещают фильтр (например, тампон из стеклянной ваты), предохраняющий сорбент от вымывания из колонки. Для повышения эффективности элюирования на входе в колонку может создаваться небольшое избыточное давление, или на выходе из нее незначительное понижение давления (вакуум). С целью понижения вязкости может применяться термостатирование колонки при повышенных температурах (40-80 °С). Следует помнить, что этот вариант ЖХ может потребовать больших затрат времени. Прежде чем проводить колоночную хроматографию, целесообразно выяснить, как ведет себя данная проба в условиях тонкослойной хро-

матографии. Для проведения колоночной хроматографии имеется ряд готовых колонок (рис. 1.30.). Однако простые устройства для хроматографии проб массой до 5 г можно собрать из деталей, имеющихся в любой химической лаборатории. В один конец стеклянной трубки диаметром около 2 см и длиной 40-50 см помещают тампон из стеклянной ваты, туго надевают на него отрезок резиновой трубки, затем трубку устанавливают вертикально на штатив. Поверх тампона насыпают несколько сантиметров чистого кварцевого песка, зажимают резиновую трубку зажимом, заливают колонку петролейным эфиром и осторожно заполняют 140 г подходящего адсорбента (активированный уголь, силикагель, оксид алюминия и др.), постукивая деревянной или стеклянной обрезиненной палочкой.

При заполнении и хроматографировании уровень адсорбента должен быть всегда ниже уровня растворителя. Верхнюю часть колонки также заполняют 2-3 см кварцевого песка. В качестве колонки можно применять бюретки на 50 мл. Обычно используют 30 г адсорбента на 1 г пробы. Кран регулируют таким образом, чтобы элюат из колонки вытекал со скоростью 1 капля в секунду. За элюированием окрашенных проб можно наблюдать невооруженным глазом.

Подбор ПФ удобно проводить по результатам тонкослойной хроматографии. Элюат целесообразно собирать одинаковыми порциями по 50 мл в конические колбы на 100 мл. Затем элюат выпаривают на ротаторном испарителе, устанавливают суммарную массу проэлюированных компонентов, чтобы убедиться, что баланс введенной пробы и выделенных фракций совпал.

Таким образом, низкоскоростная колоночная хроматография, осуществляемая при давлениях, близких к атмосферному, отличается простотой аппаратной оснастки, но низкой эффективностью, и, как следствие, плохим разрешением.

1.5.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография

В высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) применяют сорбенты с размером частиц 3 – 10 мкм, в результате чего резко возрастает эффективность хроматографического разделения. Для элюирования подвижной фазы через высокоэффективные ко-

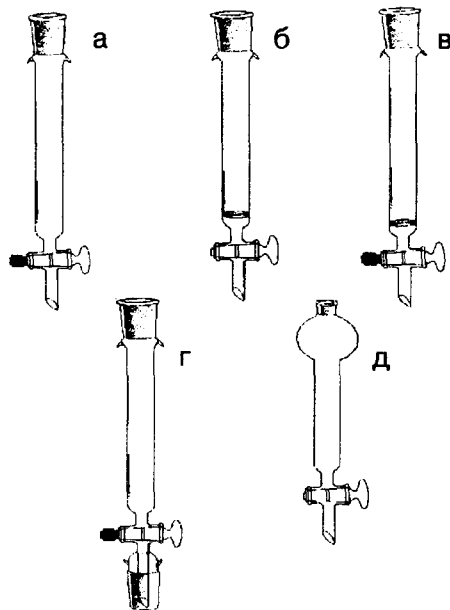


Рис.1.30. Стеклянные хроматографические колонки: а – со шлифом в верхней части и стопорным кольцом в кране; б – со шлифом в верхней части и пористой пластинкой для удерживания сорбента; в – со шлифом в верхней части, пористой пластинкой и стопорным кольцом; г – вариант колонки в с нижним шлифом; д – колонка с резервуаром для подвижной фазы.

лонки требуется насос с высоким рабочим давлением 1-20 МПа, способный точно поддерживать заданный расход элюента.

В зависимости от способа элюирования жидкостные хроматографы следует разделить на изократические и градиентные. Устройство изократического хроматографа представлено на рис. 1.31.

Подвижная фаза из емкости (1) через входной фильтр (9) подается прецизионным насосом высокого давления (2) в систему ввода образца (3) – ручной инжектор или автосамплер, туда же вводится проба. Далее через in-line фильтр (8), образец с током подвижной фазы поступает в элемент (элементы) разделения (4) – через предколонку в разделительную колонку. Затем элюат поступает в детектор (5) и удаляется в сливную емкость (7). При протекании элюата через измерительный контур детектора происходит регистрация хроматограммы и передача данных на аналоговый регистратор (самописец) (6) или иную систему сбора и обработки хроматографических данных (интегратор или компьютер). В зависимости от конструкции функциональных модулей управление системой может осуществляться с клавиатуры управляющего модуля (как правило насоса или системного контролера), с клавиатур каждого из модулей системы или производиться управляющей программой с персонального компьютера.

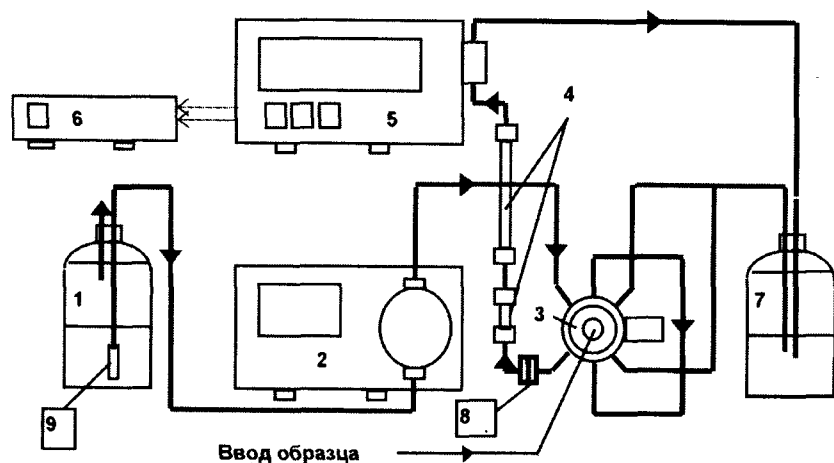


Рис. 1.31. Схема изократического хроматографа

В случае градиентного элюирования используются два принципиально различных типа жидкостных хроматографов. Они отличаются точкой формирования градиента состава подвижной фазы. Первый тип – системы с формированием состава подвижной фазы на линии низкого давления. Схема такой системы представлена на рис.1.32.

Подвижная фаза из емкостей (1) через входные фильтры (9) и программатор градиента (10) подается прецизионным насосом высокого давления (2) в систему ввода образца (3) – ручной инжектор или автосамплер, туда же вводится проба. Работой клапанов программатора градиента управляет либо управляющий модуль системы (насос или контроллер), либо управляющая программа ПК. Системы такого типа формируют бинарный, трехмерный и четырехмерный градиент. Форма функции отработки градиента зависит от конкретного управляющего модуля или программы управления, а также функциональных возможностей управляемых и управляющих модулей. Далее через in-line фильтр (8), образец с

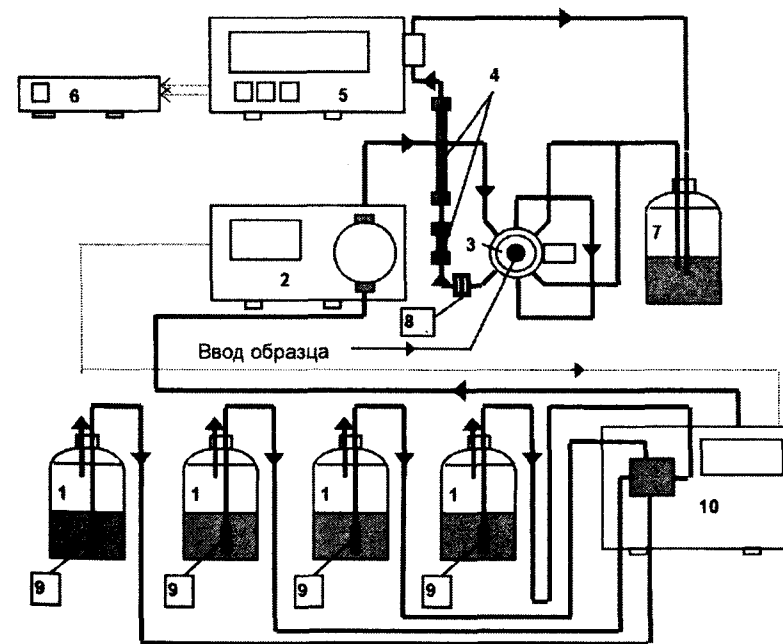


Рис. 1.32. Первая схема градиентного хроматографа

током подвижной фазы поступает в элемент (элементы) разделения (4) – через предколонку в разделительную колонку. Затем элюат поступает в детектор (5) и удаляется в сливную емкость (7). При протекании элюата через измерительный контур детектора происходит регистрация хроматограммы и передача данных на аналоговый регистратор (самописец) (6) или иную систему сбора и обработки хроматографических данных (интегратор или компьютер). В зависимости от конструкции функциональных модулей управление системой может осуществляться с клавиатуры управляющего модуля (как правило, насоса или системного контролера), или производиться управляющей программой с персонального компьютера. В случае управления управляющим модулем возможно независимое управление детектором с его собственной клавиатуры.

Несмотря на кажущуюся привлекательность таких систем (в них используется всего лишь один прецизионный насос высокого давления), данные системы обладают рядом недостатков, среди которых основным, пожалуй, является жесткая необходимость тщательной дегазации компонентов подвижной фазы еще до смесителя низкого давления (камеры программатора градиента). Она осуществляется с помощью специальных проточных дегазаторов. Из-за этого факта стоимость их становится сравнимой с другим типом градиентных систем – систем с формированием состава градиента подвижной фазы на линии высокого давления.

Принципиальным отличием систем с формированием состава градиента подвижной фазы на линии высокого давления является смешение компонентов в линии высокого давления, естественно, что при данном подходе количество прецизионных насосов определяется количеством резервуаров для смешивания подвижной фазы. При таком подходе требования к тщательности дегазации компонентов существенно снижаются. Схема градиентной ВЭЖХ системы с формированием состава подвижной фазы на линии высокого давления представлена на рис.1.33.

Подвижная фаза из емкостей (1) через входные фильтры (9) подается прецизионными насосами высокого давления (2 и 11) через статический или динамический смеситель потока (10) в систему ввода образца (3) – ручной инжектор или автосамплер, туда же вводит-

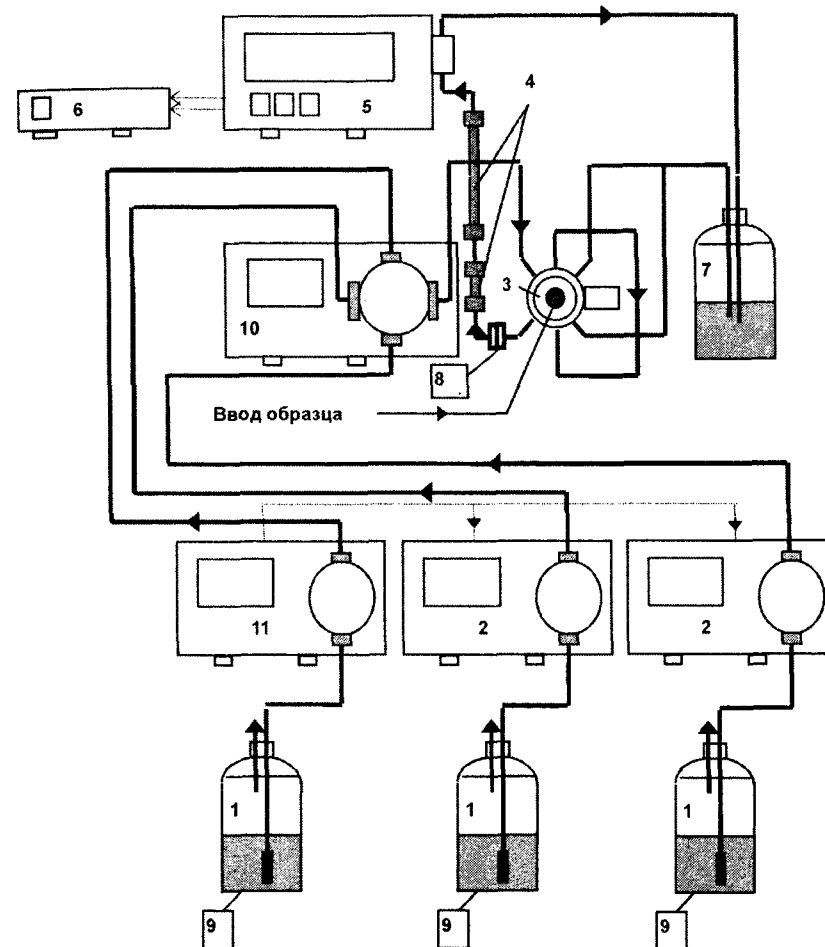


Рис. 1.33. Вторая схема градиентного хроматографа

ся проба. Работой управляемых насосов управляет либо управляющий модуль системы (насос “master pump” или контроллер), либо управляющая программа ПК. В этом случае все насосы являются управляемыми. Системы такого типа формируют бинарный или трехмерный градиент. Форма функции отработки градиента зависит от конкретного управляющего модуля или программы управления, а также функциональных возможностей управляемых и уп-

равляющих модулей. Далее через in-line фильтр(8), образец с током подвижной фазы поступает в элемент (элементы) разделения (4) – через предколонку в разделительную колонку. Затем элюат поступает в детектор (5) и удаляется в сливную емкость (7). При протекании элюата через измерительный контур детектора происходит регистрация хроматограммы и передача данных на аналоговый регистратор (самописец) (6) или иную систему сбора и обработки хроматографических данных (интегратор или компьютер). В зависимости от конструкции функциональных модулей управление системой может осуществляться с клавиатуры управляющего модуля (как правило, насоса или системного контролера), или производиться управляющей программой с персонального компьютера. В случае управления управляющим модулем возможно независимое управление детектором с его собственной клавиатуры.

Предложенные схемы являются достаточно упрощенными. В состав систем могут быть включены дополнительные устройства – термостат колонок, системы постколоночной дериватизации, системы пробоподготовки и концентрирования образца, рециклер растворителя, мембранные системы подавления фоновой электропроводности (для ионной хроматографии), дополнительные защитные системы (фильтры, колонки) и т.д. На схемах также отдельно не показаны манометрические модули. Как правило, эти устройства встраиваются в насосные блоки. Эти блоки могут объединять в себе несколько насосов, насос с программатором градиента, а также общий системный контроллер. Структура системы зависит от ее комплектации и каждого конкретного производителя.

Такое радикальное усложнение технического сопровождения хроматографического процесса приводит к возникновению ряда требований к свойствам подвижной фазы, отсутствующего в классической колоночной и планарной хроматографии. Жидкая фаза должна быть пригодна для детектирования (быть прозрачной в заданной области спектра или иметь низкий показатель преломления, определенную электропроводность или диэлектрическую проницаемость и т.д.), инертна к материалам деталей хроматографического тракта, не образовывать газовых пузырей в клапанах насоса и ячейке детектора, не иметь механических примесей [13,57].

1.5.2. Микроколоночная высокоэффективная жидкостная хроматография

В современной аналитической жидкостной хроматографии наблюдается тенденция к миниатюризации хроматографических колонок. Базовые характеристики хроматографической колонки подробно рассмотрены в разделе 2.1 следующей главы. Отметим, что микроколонки имеют, в отличие от стандартных колонок, в 15-20 раз меньший объем сорбента при уменьшении длины колонки в 3-5 раз, диаметра колонки в 2-10 раз, а размеров частиц в 1.5-2 раза. Для микроколоночной ВЭЖХ характерна в 5-10 раз меньшая объемная скорость потока элюента. Примерно в 2-5 раз меньше и максимальное рабочее давление. При миниатюризации колонки изменяются линейная скорость потока, соотношение вкладов вихревой и продольной диффузии, внешней и внутренней диффузии, в результате чего трансформируется кинетика сорбционных процессов, скорость массообмена в подвижной и неподвижной фазах [57,238-243]. Это приводит к тому, что при сохранении общих с классической ВЭЖХ тенденций появляются особенности, которые необходимо учитывать при оптимизации аналитических методик с использованием микроколонок. Микроколоночные хроматографы сконструированы таким образом, чтобы обеспечить стабильные малые скорости потока и малое уширение концентрационных зон. Насос должен стабильно подавать растворитель при высоких давлениях (4-40 МПа) и небольших расходах (10-200 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, что также не удается осуществить, используя типовые 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 1-10 мм). Для градиент-

ной микроколоночной ВЭЖХ возникают дополнительные проблемы, связанные с микроподачей элюента в начале и конце градиента (от 1% обычного расхода для микроколонок), и созданием эффективного микросмесителя вместимостью от 1 до 20 мкл. Более сложным является высококачественная упаковка сорбентами микроколонок с внутренним диаметром 0.5-2 мм. Да и требования к свойствам самих сорбентов (механической прочности, пористости и пр.) также могут радикально меняться. Ограничен круг детекторов с микроюветами вместимостью 0.03-2 мкл, пригодных для работы с микроколонками, которые серийно производят в достаточно широком масштабе и по доступным ценам. Такими детекторами являются некоторые УФ фотометры, спектрофотометры, флуоресцентные детекторы, электрохимические детекторы. Очень интересным и информативным является сочетание микроколоночной ВЭЖХ с хромато-масс-спектрометром, позволяющее существенно упростить проблему интерфейса для ряда применений, только высокая стоимость такого детектора ограничивает его широкое применение. В настоящее время фирма "Finnigan" выпускает масс-спектрометры, сочетающиеся с жидкостным хроматографом, благодаря развитию микроколоночной и капиллярной ВЭЖХ. Разработаны системы прямого ввода потока элюента в ионный источник масс-спектрометра. При этом оптимальные расходы элюента составляют 3-30 мкл/мин, что характерно для колонок с внутренним диаметром 0.5-1 мм, заполненных сорбентом зернением 5-10 мкм. Экстраколоночное расширение пиков в совмещенном с масс-спектрометром хроматографе сравнимо с аналогичным уширением для УФ детекторов с объемом проточной ячейки 0.3 мкл. Лазерные источники излучения позволяют создать микроюветы для рефрактометров и ИК-детекторов. Несмотря на ряд сложностей, микроколоночные хроматографы успешно совмещены с ИК-спектрометром. Одна из проблем этого комбинированного метода – типовые для жидкостной хроматографии растворители сильно поглощают в средней части ИК области спектра. В качестве элюентов возможно применение дейтерированных или полностью галогенированных органических соединений. Эти дорогие растворители при использовании в режиме микроколоночной ВЭЖХ в результате небольшого расхода становятся более доступными.

1.5.3. Капиллярная жидкостная хроматография

Капиллярная жидкостная хроматография – микромасштабная хроматография в пленке жидкости или слое сорбента, размещенном на внутренней стенке полых капиллярных колонок [51, 238, 240, 241]. В последнее время происходит ренессанс капиллярной ЖХ на базе успехов в создании прецизионных возвратно-поступательных микронасосов высокого давления для микро- и нанокколонок диаметром 0.3-0.5 мм с использованием монокристаллических наносорбентов. Фирма "Хьюлетт-Паккард" освоила выпуск колонок с внутренним диаметром 100 микрон. Капиллярная ЖХ позволяет проводить мультиканальный анализ, в котором можно задействовать до 100 микроколонок. Очевидным преимуществом этого метода является получение более высокой эффективности, чувствительности и экспрессности анализа. Эффективность реализуется за счет преимуществ полых капиллярных колонок. Более высокая чувствительность может быть получена в связи с малыми расходами потока подвижной фазы (0.1–1.0 мкл/мин) и обусловленной этим возможностью их прямого соединения с более чувствительными детекторами, применяемыми в газовой хроматографии (ионизационно-пламенным, термоионным, пламенно-фотометрическим, фотоионизационным, электронозахватным детекторами), масс-спектрометром, ИК-спектрометром и ядерно-магнитно-резонансным спектрометром. В то же время для капиллярной ЖХ выпускают привычные для ВЭЖХ спектрофотометрические, флуоресцентные и электрохимические детекторы с микроюветами. Хроматография – это процесс разделения, связанный с разбавлением. Коэффициент разбавления пропорционален длине колонки и квадрату ее диаметра и обратно пропорционален корню квадратному из числа теоретических тарелок. В связи с уменьшением диаметра колонки концентрация компонента в максимуме пика резко возрастает, что также приводит к увеличению чувствительности обнаружения при применении колонок малого объема. Концентрация определяемого компонента в максимуме пика в 100 раз больше, чем для обычных колонок для ВЭЖХ. При использовании капиллярных микроколонок привлекателен небольшой расход подвижной фазы. За рабочую смену в 7 часов расход составляет 4-5 мл [238], что позволяет шире использовать в методе

дорогие, токсичные, горючие или экзотические растворители в качестве подвижных фаз К примеру, применение дейтерированных растворителей целесообразно при использовании сочетаний капиллярной ВЭЖХ с ИК- и ЯМР-спектроскопией. Применение низших алканов и диоксида углерода, отличающихся низкой вязкостью, позволяет проводить высокоскоростное разделение. Однако низкокипящие подвижные фазы требуют модификации аппаратуры, поскольку она должна выдерживать давление, превышающее давление паров компонентов подвижной фазы. В отличие от стандартной и микроколоночной ВЭЖХ в капиллярной ВЭЖХ не используют плотноупакованных колонок. В этом варианте применяют свободноупакованные и открытые безнасадочные типы колонок, фактор сопротивления ϕ для которых варьирует в диапазоне 32-300. Диаметр типичных свободноупакованных насадочных капиллярных колонок – 0.05-0.2 мм, открытых безнасадочных – 0.01-0.06 мм. В настоящее время уже испытаны колонки с внутренним диаметром 6 и 10 мкм. При разделении смеси изомеров хлоранилина и хлортолуидина на таких колонках длиной 830 см и перепаде давления 19 МПа получена эффективность $N=5 \times 10^4$ теоретических тарелок при продолжительности анализа менее 6.5 мин [4]. При разделении методом ЖХ на открытых и насадочных капиллярных колонках достигнуть высокого разрешения удастся путем простого удлинения колонки. Следует иметь в виду, что перепад давления на таких колонках достаточно высок, в связи с чем предъявляются повышенные требования к герметичности дозаторов, коммуникаций и мест соединения дозатора с колонкой и насосом.

Для сопоставления характеристик капиллярных колонок с колонками других типов, работающих в неодинаковых условиях, применяют *параметр сопротивления разделения* [238]:

$$E = (H')^2 \phi \quad (1.40)$$

У безнасадочных колонок показатель E ниже, чем у насадочных как с плотной, так и со свободной набивкой. Это означает, что ЖХ на них позволяет добиться большей эффективности, чем на насадочных колонках ВЭЖХ. Поэтому капиллярные колонки начинают серьезно конкурировать с насадочными.

В качестве колонок используют трубки из тефлона, нержавеющей стали, стекла, кварца. Наибольшую эффективность дают ко-

лонки из кварцевого и обыкновенного стекла, благодаря гладкости и химической инертности их внутренней поверхности. В качестве неподвижных фаз рассматривают β , β' -оксидипропионитрил. В этом случае элюент необходимо предварительно насыщать неподвижной фазой, чтобы эффективность колонки быстро не ухудшалась. Внутреннюю поверхность стеклянной или кварцевой колонки можно подвергнуть обработке щелочью или травлению. Они приобретают способность к адсорбции. Протравленные и модифицированные октадецилсилильными группами колонки из кварца, мягкого и боросиликатного стекла получают свойства обращенной неподвижной фазы. Полистирольные или полисилоксановые неподвижные фазы становятся неэкстрагируемыми после проведения сшивки их макромолекул. Пропустив через колонку катионный или неионогенный детергент, можно динамически модифицировать силикагель, получив гидрофобную неподвижную фазу.

Малая теплоемкость капиллярных микроколонок облегчает применение режима программирования температуры, который требует менее сложного аппаратного сопровождения по сравнению с градиентным элюированием. Программирование температуры позволяет уменьшить продолжительность анализа и повысить чувствительность определения [238].

С точки зрения полной реализации высоких потенциальных возможностей и преимуществ капиллярной ЖХ, можно сформулировать следующие требования к аппаратуре для этого метода: диапазон расходов и максимальное давление подвижной фазы, создаваемые насосом, должны соответствовать оптимальной скорости элюирования для получения максимальной эффективности (например, для капиллярной колонки диаметром 5 мкм оптимальный расход составляет 0.002 мкл/мин, при этом максимальное давление на входе в колонку может быть до 50.0 МПа); размер вводимой пробы должен соответствовать диаметру колонки с целью устранения ее перегрузки и снижения в связи с этим эффективности разделения; рабочий объем детектора должен также соответствовать параметрам колонки; необходимо предусмотреть практически полное отсутствие “мертвых” объемов от дозатора до детектора. Наличие микропузырьков может свести детектирование на нет, поэтому раз-

работаны и реализованы в современных микрокапиллярных жидкостных хроматографах устройства непрерывного дегазирования.

Обзор примеров прикладного использования капиллярной жидкостной хроматографии приведен в [238-241].

1.6. Планарная жидкостная хроматография

В арсенале хроматографических методов выделяется простой и доступный по эксперименту выполнения метод – *планарная жидкостная хроматография*. Относительная дешевизна и доступность используемых реактивов и оборудования в сочетании с высокой информативностью и чувствительностью этого метода позволяют широко использовать его в рутинных анализах [51,58,246-270].

Планарная жидкостная хроматография – способ хроматографии, в котором процессы разделения смеси веществ осуществляют-

ся в плоском слое сорбента. Метод предложен в 1938 году отечественными учеными Н.А. Измайловым и М.С. Шрайбер [253]. Однако широкие возможности метода были открыты позднее благодаря работам Ю. Кирхнера и Э. Шталя [246,247]. Последний стандартизовал метод, разработал оборудование для его реализации, показал универсальную применимость планарной хроматографии и написал первое руководство по ее практическому использованию.

На рис. 1.34. представлена классификация методов планарной хроматографии. В первую группу методов входит *бумажная хроматография*, в которой в качестве сорбента используют специальную бумагу, и *тонкослойная хроматография* (ТСХ), в которой процессы разделения смеси веществ осуществляются в тонких слоях сорбента нанесенного на инертную твердую подложку или в пленках пористого полимерного материала.

В этих вариантах ЖХ движение элюента происходит под действием капиллярных сил. Разновидностью ТСХ является высокоэффективная ТСХ, которая представляет собой комплекс методов и средств, позволяющих реализовать в ТСХ высокую эффективность, чувствительность, скорость и т.д., она требует не меньшего аппаратного сопровождения, чем ВЭЖХ.

В методе ТСХ, как и в колоночной ЖХ, могут быть реализованы нормально-фазовый, обращенно-фазовый, мицеллярный и хиральный варианты хроматографирования. Наиболее распространен вариант НФХ, последние три разновидности ТСХ находят применение в последнее время.

В другой группе методов планарной ЖХ движение элюента происходит под действием различных приложенных внешних сил. Это ТСХ под давлением, вариантом которой является круговая ТСХ под высоким давлением и ТСХ под действием центробежной силы (ротационная ТСХ). В настоящее время из методов планарной хроматографии наиболее часто применяют ТСХ и ВЭТСХ.

1.6.1. Хроматография на бумаге

Бумажная хроматография, открытая в 1944 г., до сих пор используется в малобюджетных лабораториях на предприятиях пищевой про-

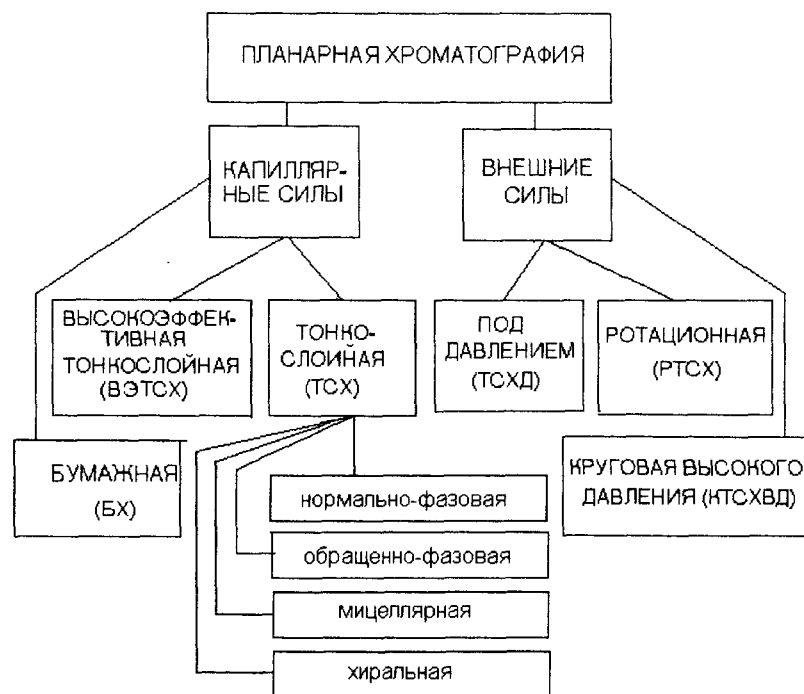


Рис.1.34. Классификация методов планарной хроматографии

мышленности и в образовательных учреждениях, поскольку является самым простым и дешевым хроматографическим методом. Она может сочетаться с электрофорезом, дополнять метод ТСХ, а в отдельных случаях конкурировать с ним [78,255-257]. БХ можно разбить на распределительную, адсорбционную и ионообменную. В качестве твердого носителя неподвижной фазы применяют целлюлозную фильтровальную бумагу особой чистоты и некоторых специальных свойств. Для ее изготовления обычно используют коротковолокнистую целлюлозу (линтер), которая содержит 98-99% α -целлюлозы, до 1% β -целлюлозы и менее 1% пентозанов. Другой важной характеристикой бумаги является длительность капиллярного подъема на определенную высоту (30 см). Она зависит от плотности бумаги и от густоты сетки волокон бумаги. Более плотная бумага (более гладкая и менее проницаемая) имеет меньшую высоту подъема растворителя по капиллярам. Чем волокна рыхлее, тем больше высота подъема. По скорости подъема хроматографическая бумага делится на медленную, среднюю, быструю и очень быструю. Традиционные высококачественные сорта бумаги для БХ выпускают фирмы Whatman, Schleicher&Schüll, Macherey-Nagel и Ederol. Одна из лучших марок – бумага ватман №4. В аппаратуру для БХ входят различные типы камер (стеклянные цилиндрические сосуды, колбы Эрленмейера и др.), пипетки или микродозаторы для нанесения проб, сушильные шкафы, камеры для облучения хроматограмм, пульверизаторы для химического проявления, денситометры. При подборе растворителя исходят в первую очередь из способности растворителя растворять сорбат. Высокогидрофильные вещества элюируют полярными растворителями, содержащими воду. Например, аминокислоты и сахара следует хроматографировать подвижной фазой типа смесь 1-бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:5) или смесью уксусная кислота – вода (15:85), среднегидрофильные вещества хорошо элюировать этилацетатом, бутилацетатом или хлороформом, часто насыщенными водой. Гидрофобные компоненты в настоящее время редко анализируют при помощи БХ. Чаще всего механизм разделения на бумаге распределительный (жидко-жидкостная хроматография), поэтому растворители насыщены, как правило, водой, а бумага должна быть также достаточно влажна. Полярность подвижной фазы подгоняют, добавляя небольшие количества сильнополярного растворителя

к малополярному. Адсорбцию подавляют, добавляя более полярный компонент к разбавляющей системе, лучше смачивая бумагу или пропитывая ее полярным органическим растворителем в качестве неподвижной фазы. В случае диссоциации сорбата для улучшения формы пятен к растворяющей системе добавляют летучую кислоту, более сильную, чем сорбат (или основание). Это приведет или к полной ассоциации молекул сорбата, или к истощающей диссоциации. Очевидно, что правильный выбор pH весьма важен для хорошего разделения диссоциирующих веществ. С техникой эксперимента БХ и конкретными методиками анализа ряда органических и неорганических веществ возможно детально ознакомиться в [58,255-257].

1.6.2 Тонкослойная жидкостная хроматография

В методе ТСХ неподвижная фаза тонким слоем (100-300 мкм) наносится на стеклянную, металлическую или пластмассовую пластинку. В качестве сорбента чаще всего используют силикагель, оксид алюминия, целлюлозу, кизельгур, полиамиды. На линию старта (1.5-2 см от края пластинки) очень малым пятном наносят анализируемую смесь и стандартные вещества. Для этого используют капилляры, микропипетки или микрошприцы. Затем пластинку в герметичной камере погружают в растворитель, который выполняет роль подвижной фазы. Под действием капиллярных сил растворитель движется вдоль слоя сорбента до финиша и с разной скоростью переносит компоненты смеси, что приводит к их разделению. Принцип разделения такой же, как в других видах хроматографии, – неодинаковое сродство разделяемых органических веществ к подвижной жидкой фазе и стационарному сорбенту. После достижения элюентом линии финиша пластинку высушивают и проводят идентификацию компонентов. Разделенные компоненты на пластинке или полоске бумаги образуют отдельные зоны (пятна). Многие вещества не обнаруживаются в видимой области, и для их разделения невидимые зоны проявляют опрыскиванием пластины ТСХ специальными реагентами [51,58,246-253]. Для обнаружения пятен можно использовать УФ излучение или термическую деструкцию веществ. Для получения информации о качественном и количествен-

ном составе анализируемой смеси можно использовать различные методы детектирования – как химические, так и физические. Выделив вещество из сорбирующего слоя пластинки тем или иным способом, его можно подвергнуть идентификации методами ИК-, ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии и др. В последние годы значительно возросло использование ферментативных методов, особенно в клинической диагностике при определении пестицидов. Пластинки ТСХ выполняют роль носителя, с которого химическая, физическая или ферментативная информация может быть считана в любом месте и в любое удобное время. Отсюда следует, что селективность (избирательность) метода ТСХ складывается из селективности процесса разделения и специфичности детектирования, взятых вместе. Это преимущество присуще только ТСХ.

Важной характеристикой степени разделения определяемых соединений в планарной хроматографии является величина $R_f = x/y$ – отношение расстояния от центра пятна на пластинке до линии старта (x) к расстоянию (y), пройденному растворителем от линии старта до финиша. Величина R_f является характеристикой природы определяемого соединения и зависит от сорбента и растворителя, используемых для разделения (рис.1.35.)

Для надежности идентификации веществ при определении R_f часто используют “свидетели”. Для этого на пластинке вместе с разделяемой смесью веществ хроматографируют стандартные вещества (“свидетели”).

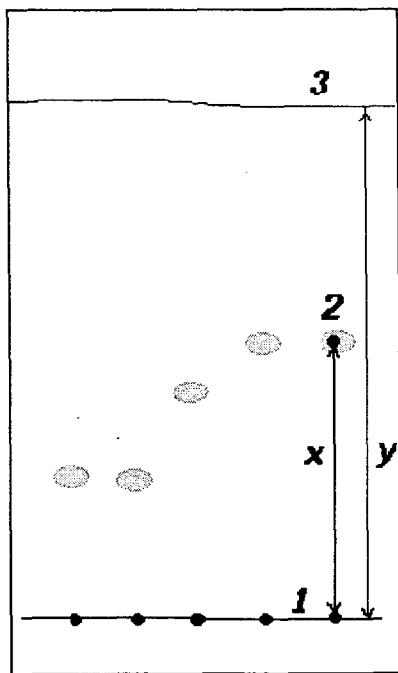


Рис.1.35. Определение R_f на тонкослойной хроматограмме: 1 – линия старта; 2 – пятно; 3 – фронт растворителя

Правильный выбор сорбента и подвижной фазы определяет эффективность (полноту) разделения. Подбор хроматографической системы обуславливается природой анализируемой смеси.

Например, насыщенные углеводороды сорбируются в очень малой степени и поэтому движутся в сорбенте с более высокой скоростью. Ненасыщенные углеводороды сорбируются тем сильнее, чем больше в них содержится двойных связей. Для их разделения следует использовать наиболее активные сорбенты и малополярные растворители. Для органических веществ, содержащих разные функциональные группы, адсорбционное сродство повышается в следующем ряду: алканы, алкены, арены, простые эфиры, сложные эфиры, кетоны, альдегиды, спирты, амиды, диолы, карбоновые кислоты, полифункциональные соединения. Это приводит к тому, что на слоях силикагеля или окиси алюминия при применении в качестве растворителя, например бензола, простые или сложные эфиры располагаются в верхней части хроматограммы, кетоны и альдегиды – примерно в середине, спирты – ближе к линии старта, а кислоты остаются на старте. Отличия от указанного порядка могут быть связаны с сильной разницей в молекулярной массе или в структуре углеродного скелета. В условиях обращенно-фазовой ТСХ порядок элюирования меняется на противоположный.

Таким образом, идентификацию веществ (качественный анализ) проводят в первую очередь по равенству значений R_f анализируемого вещества и стандарта (“свидетеля”), а также по цветной реакции, присущей искомому компоненту. Если на хроматограмме образуются окрашенные зоны, то это значительно упрощает ее обработку. Невидимые хроматограммы проявляют (находят зоны разделенных веществ) химическими и физическими способами. При химическом способе пленку или бумагу опрыскивают раствором или держат в парах взаимодействующего с компонентами анализируемой смеси реагента. Эти реактивы разделяют на два типа: 1) реактивы общего назначения, позволяющие обнаружить большое число соединений различных классов; 2) специфичные реактивы, позволяющие обнаружить соединения определенного класса или с определенной функциональной группой. К реагентам общего назначения относятся концентрированная серная кислота, раствор бихромата калия в концентриро-

ванной серной кислоте, 1%-ный спиртовой раствор иода, фосфорномолибденовая кислота, родамин. Примеры специфических реагентов-проявителей для обнаружения различных классов органических соединений приведены в [51, 58, 246-253]. Например, фенолы дают цветную реакцию с 1% раствором хлорного железа (III), оксосоединения проявляются 2,4-динитрофенилгидразином, аминокислоты и аминокислоты проявляются нингидрином. В биохимическом анализе применяют реакции ингибирования ферментативных реакций на хроматографической пластинке для идентификации веществ. Одно из существенных преимуществ ТСХ по сравнению с бумажной хроматографией – возможность использования агрессивных проявителей.

При физическом способе проявления зон пластинку облучают УФ лучами. В зависимости от типа пластин сорбент может содержать флуоресцентные индикаторы (силикаты цинка, сульфиды цинка или кадмия, вольфраматы щелочноземельных металлов), и пластинка при облучении светится бледно-голубым или зеленоватым светом. Пластинки с флуоресцентными индикаторами (люминофорами) с $\lambda=254$ и 365 нм выпускают многие фирмы. Тот же принцип детектирования реализуют, опрыскивая пластинки флуоресцирующими реагентами (водные растворы флуоресцеина натрия или родамина В, растворы морина в метаноле, 2'- и 7'-дихлорфлуоресцеина в этаноле). Если на пластинке есть вещества, способные поглощать УФ излучение (ароматические и содержащие сопряженные C=C-связи вещества), то происходит ингибирование флуоресценции. Поэтому на ярком фоне пластинок появляются темные зоны, соответствующие определяемому соединению. Одним из наиболее чувствительных способов детектирования является способ, в котором собственную флуоресценцию сорбата наблюдают при облучении пластин УФ-светом с длиной волны, возбуждающей флуоресценцию определяемого компонента. Существует большое количество реактивов, превращающих не флуоресцирующие вещества в флуоресцирующие при обработке до или после ТСХ.

В ТСХ для идентификации, как сказано выше, проводят по величинам R_f разделенных соединений в сравнении с R_f реперных образцов, дополнительно используя для проверки аутентичности качественные цветные реакции. Но более информативная идентифи-

кация веществ достигается при использовании методов ИК-, ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии). Совпадения спектральных характеристик анализируемых и эталонных веществ является подтверждением их идентичности.

Количественный анализ осуществляют либо непосредственно на хроматограмме (на слое сорбента), либо зону вещества извлекают из тонкого слоя пластины, затем переводят в раствор или другую форму пробы, удобную для анализа тем или иным методом. Предпочтение отдается анализу *in situ*, т.е. непосредственно на пластине. Визуально оценивается размер пятна (площадь) или проводится инструментальное измерение интенсивности поглощения электромагнитного излучения при сканировании хроматографической пластинки (сканирование денситометром, флуориметром и др.). В результате регистрируется хроматограмма, которая имеет форму, аналогичную для инструментальных видов жидкостной хроматографии. Многие фирмы выпускают оборудование для оптического сканирования тонкослойных хроматограмм. Например, универсальную сканирующую установку выпускает фирма "Opton", на которой можно работать в проходящем, отраженном свете, измерять флуоресценцию, гашение флуоресценции. Все операции автоматизированы. Фирма "Shimadzu" выпускает сканирующие устройства с двухволновым сканированием в интервале 200-800 нм, с использованием однолучевой системы с переменной и постоянной длиной волны, двухлучевой системы и флуориметра. Двухлучевая система позволяет количественно определять какой-либо компонент в хроматографическом пятне, в котором присутствует еще одно вещество. Фирма "Camag" выпускает сканеры, позволяющие измерять поглощение, флуоресценцию, гашение флуоресценции в различных вариантах ТСХ. Приборы для количественной ТСХ выпускают также фирмы "Ленхром" и "Сорбполимер". Например, видеоденситометр Сорбфил, выпускаемый последней фирмой, предназначенный для расчета параметров и количественной оценки в ТСХ, отличается простотой конструкции, умеренной ценой, достаточно высокой точностью результатов (погрешность 3-10%) и ориентирован на малобюджетную лабораторию.

На рис. 1.36. приведен пример преобразования отсканированного изображения пятен тонкослойной хроматограммы в хро-

тографическую функцию с пиками. В отчете программа выдает информацию о площадях пика, высоте, асимметрии пика и т.д.

Этот денситометр не требует изменения существующих методик ТСХ и может рассчитывать любую хроматографию, видимую в дневном или ультрафиолетовом свете с длинами волн 365 и 254 нм. В его состав входят осветительная камера (дневной свет, ультрафиолетовый), спектр излучения 254 и 365 нм, цветная видеокамера, блок ввода видеоизображения, компьютер и программа оценки и расчета параметров хроматографии, работающая в операционной системе Windows. Видеосистемы в значительной мере вытеснили обычную фотографию как средство регистрации и архивирования различных объектов, в том числе и ТСХ. Использование компьютерных технологий позволило осуществить не только сохранение записанных изображений, но и выполнение расчетов хроматограммы на базе цифрового видеоизображения хроматограммы. Отличительными чертами денситометрии с использованием видеотехнологий являются: высокая скорость расчетов, низкая стоимость расходных материалов, сохранение хроматограммы в электронном виде, что позволяет ее копировать и использовать для расчетов в любое время на любом компьютере, снабженном соответствующей программой. Для целей количественного анализа тонкослойных пятен пригодно даже типовое программное обеспечение по обработке изображений, полученных с помощью стандартного планшетного сканера.

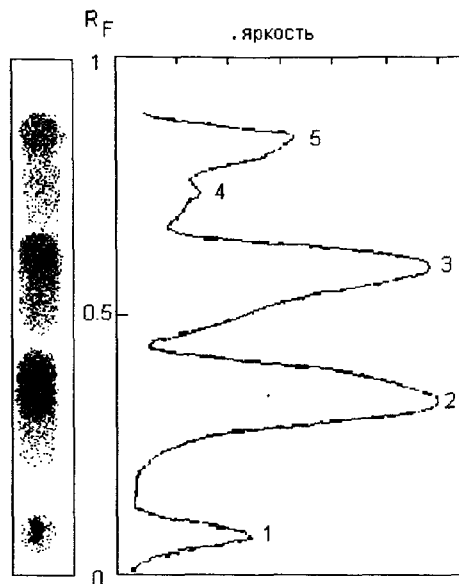


Рис. 1.36. Результат обработки трека тонкослойной хроматограммы: сглаженная по 9 точкам хроматографическая функция с 5 пиками: $R_{f1}=0.04$; $R_{f2}=0.32$; $R_{f3}=0.61$; $R_{f4}=0.77$; $R_{f5}=0.89$

С точки зрения неординарного подхода к составу подвижной фазы, следует выделить *мицеллярную тонкослойную хроматографию*. В этом методе в качестве подвижной фазы применяют водные растворы поверхностно-активных веществ (ПАВ). В [267-272] показана возможность разделения с использованием ПАВ 1,3-дикетонатов ряда металлов, производных флуоресцеина, сульфоталесинов, фенолкарбоновых кислот, синтетических пищевых красителей и ионов металлов. В качестве катионных ПАВ применяют хлорид цетилпиридиния, бромид цетилтриметиламмония, в роли анионных ПАВ апробирован додецилсульфат натрия, а в качестве неионных ПАВ – Твин-80. ПАВ модифицируют не только подвижную фазу, но и неподвижную. Разделение зависит от типа сорбата, сорбента, концентрации ПАВ, pH и модифицирующих органических добавок. В целом чем гидрофобнее сорбат, тем меньше его удерживание. Мицеллярные подвижные фазы относят к так называемым организованным средам [272], которые гомогенны и однофазны в макромасштабе, но микронеоднородны и двухфазны на наноуровне. Их принципиальное отличие от обычных водных, неводных или смешанных водно-органических истинных растворов состоит в том, что в хроматографическом процессе определяющую роль играет не состав и состояние подвижной фазы в ее основной массе, а только состав и свойства среды вблизи сольватированной поверхности сорбента и сорбата (эффект локализации). В связи с наличием этого эффекта уникальные полярные свойства водной жидкой фазы сочетаются с гидрофобными свойствами ПАВ, давая возможность одновременного хроматографирования гидрофобных и гидрофильных компонентов смеси.

Применение ПАВ в составе элюента позволяет также снизить при проведении ТСХ расход токсичных, летучих, и достаточно дорогих органических растворителей (бензол, хлороформ, тетрахлорметан, дихлорметан, ацетон, толуол, бутанол, метанол и др.).

После бурного развития в 60-70-х годах ТСХ, потесненная в 90-х годах методом ВЭЖХ, в последние годы получила новый импульс для развития и наблюдается возрастание его роли в хроматографических методах. Это связано с меньшей стоимостью оборудования для ТСХ, разработкой двумерного и радиального вариантов разделения, внедрением пластин для высокоэффективной хроматографии,

появлением систем автоматизированного многократного хроматографического проявления (АМХП). В двумерной хроматографии анализируемую смесь элюируют одним растворителем (или смесью), затем пластинку сушат и под углом 90° элюируют вторым растворителем. В радиальной хроматографии растворитель с регулируемой скоростью подается в центр пластинки, заставляя зоны перемещаться от центра к периферии. Это позволяет существенно ускорить процесс разделения. Особенно перспективной является методика АМХП. Хроматографическое разделение проводят в АМХП-системе, работа которой управляется и контролируется при помощи компьютера. Проводят многократное хроматографическое проявление (прогон растворителя). При таких многоступенчатых проявлениях (до 25 шагов) с возрастающей длиной полосы разделения и градиентным ступенчатым уменьшением полярности растворителя возможно разделение до 40 веществ на разделительной полосе длиной 8 см.

Важное значение имеет развитие *высокоэффективной тонкослойной хроматографии* (ВЭТСХ). За счет создания принудительного движения подвижной фазы с регулируемой скоростью, уменьшения размера частиц сорбента (до 5-7 мкм) и насыщения пространства над пластиной парами растворителя удается существенно ускорить процесс и повысить четкость разделения. ВЭТСХ представляет собой комплекс методов и средств, которые позволяют реализовать в ТСХ высокую эффективность, чувствительность, скорость, воспроизводимость, пиковую емкость при одномерном разделении. ВЭТСХ – инструментальный метод разделения и анализа, что усложняет и удорожает этот метод. Таким образом, при выборе метода ТСХ-анализа исходят из доступности и наличия оборудования, его стоимости и аналитической задачи. Поэтому используют как ТСХ, так и ВЭТСХ, а также сочетание этих методов или их отдельных элементов [51].

Широко используется сочетание ТСХ с другими методами, в частности, с ВЭЖХ. Например, анализируемый образец первоначально разделяют на фракции на колонках ВЭЖХ, собирая их в коллекторе фракций, затем отдельные фракции наносят на пластинки ТСХ и проводят разделение с использованием методики АМХП. Таким образом, в анализируемой смеси разделяется до 30

отдельных фракций. В каждой из этих фракций, в свою очередь, на пластинке ТСХ определяется до десяти соединений. В отдельных случаях в образцах таким образом обнаруживали присутствие до 300 веществ. Такой прием продемонстрировал эффективность совместного использования двух хроматографических методов при определении веществ в диапазоне концентраций от нанограммов до пикограммов. Есть примеры сочетания ТСХ и газохроматографическим пламенно-ионизационным детектором (ПИД), когда на первом этапе идет разделение в тонком слое, а на втором этапе перевод анализируемых веществ из тонкого слоя в газовую фазу с последующим количественным детектированием на ПИД. Вместо пластин для ТСХ использовали стеклянно-керамические стержни диаметром 0.9 м со слоем силикагеля толщиной 50-100 мкм, которые для анализа протягивались через ПИД. Преимущество метода ТСХ-ПИД в его универсальности, высокой чувствительности ко всем классам органических соединений, но оптимален он для анализа веществ, обладающих средней летучестью.

В целом ТСХ является разновидностью ЖХ, поэтому основные механизмы разделения, присущие ЖХ, реализуются и в ТСХ. В первую очередь – это адсорбционная хроматография на силикагеле и оксиде алюминия. Применяют и режимы нормально- и обращенно-фазовой ЖХ, ион-парной обращенно-фазовой, ионообменной, эксклюзионной и даже хиральной хроматографии. Отличительной особенностью ТСХ от ВЭЖХ является независимость и произвольность выбора растворителя для подвижной фазы, поскольку нет ограничений, связанных с методом детектирования. При этом понятие подвижная фаза и растворитель в ТСХ не всегда тождественны. Состав жидкости в резервуаре в результате хроматографических процессов несколько отличается от ее состава в сорбенте, играет важную роль и газовая фаза, из которой сорбент насыщается молекулами растворителя [252].

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКАЯ КОЛОНКА, СВОЙСТВА СОРБЕНТОВ

2.1. Базовые характеристики хроматографической колонки

Хроматографическая колонка – центральная, принципиально главная часть хроматографической системы. В абстрактном виде колонку можно представить как цилиндрический слой неподвижной фазы, взаимодействующий в процессе хроматографического разделения с подвижной фазой и растворенным в ней сорбатом. Молекулы сорбата мигрируют по колонке, когда они находятся в подвижной фазе, и остаются на месте, когда находятся в неподвижной фазе. Чем больше сродство сорбата 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 концентрационные зоны (пики) компонентов по мере их продвижения по колонке с подвижной фазой.

Хроматографическое разделение возможно только в том случае, если компоненты образца, попадая в колонку при вводе пробы, во-первых, будут растворены в ПФ и, во-вторых, будут обратимо взаимодействовать с НФ. 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 НФ, пройдут через колонку вместе с фронтом ПФ, не разделяясь на индивидуальные пики.

2.1.1. Геометрия колонок

Реальная колонка имеет геометрию удлиненного цилиндра с жесткими стенками, изготовленного из металлических, стеклянных или полимерных трубок. Колонка может быть наполнена сорбентом, или представлять собой полую трубку с нанесенным на внутреннюю поверхность сорбентом, в объеме которого осуществляет-

ся хроматографическое разделение смеси веществ. Успешная реализация хроматографического процесса зависит не только от выбранных условий хроматографии (параметров сорбента и подвижной фазы), но и от технических характеристик колонки в целом. Колонка должна быть равномерно заполнена максимально однородным слоем сорбента, должны быть сведены к минимуму мертвые объемы в колонке и во всем хроматографическом тракте между инжектором, колонкой и детектором. Объем коммуникаций хроматографа и мертвые объемы должны быть в 3-10 раз меньше объема пика несорбируемого соединения. Размеры колонки и качество сорбента должны обеспечивать задачи разделения.

В зависимости от геометрии и назначения (площади поперечного сечения и длины) колонки можно разделить на макромасштабные препаративные, препаративные, полупрепаративные, стандартные аналитические колонки, микроколонки и капиллярные колонки (табл. 1.1.). Трубка стандартной аналитической колонки с обеих сторон закрывается фильтрами (фритами), предотвращающими высыпание сорбента из колонки, а также препятствующими разрушению

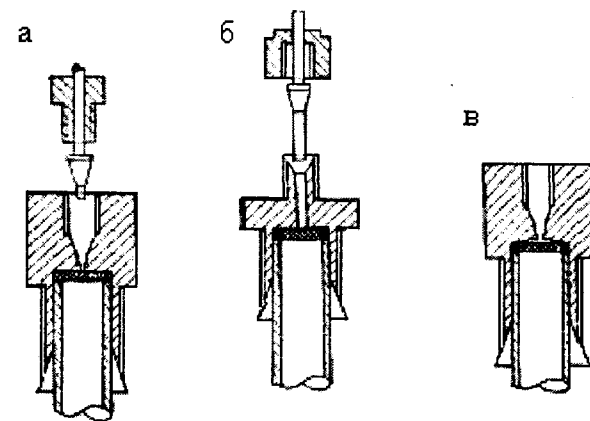


Рис. 2.1. Классические типы соединения колонок с хроматографическим трактом: **а** – соединитель с малым мертвым объемом, компрессионной гайкой и фильтром обычного типа; **б** – соединитель с нулевым мертвым объемом, наружной гайкой и фильтром, запрессованным в политрифторхлорэтилен; **в** – соединитель с малым мертвым объемом и распределительным конусом

слоя сорбента механическими примесями, присутствующими в пробе или подвижной фазе. С детектором и дозатором колонка соединена стандартными капиллярами с наружным диаметром 1.6 мм. Внутренний диаметр капилляров составляет 0.2-0.3 мм. Фильтры имеют диаметр пор около 2 мкм. Фильтры и капилляры крепятся на колонке штуцерами разной конструкции, в состав фитингов входят также уплотняющие кольца и конусы (рис. 2.1.).

Выпускаются также колонки с конструкцией патрона. В этом случае колонка выполнена из полимера и заключена в кожух, в котором создается высокое давление, обеспечивающее плотный контакт частиц сорбента со стенкой колонки за счет частичной деформации последней. Функции фильтров в колонке не ограничиваются удерживанием сорбента, они распределяют поток и пробу, попадающие в начало колонки.

Необходимость перехода от малого диаметра в капилляре к большому в трубке самой колонки, высокий перепад давлений на колонке в процессе упаковки и при работе, недопустимость образования мертвых объемов обуславливают конструкционные особенности колонок. Для получения высокой эффективности колонки большое значение имеет высокое качество обработки внутренней поверхности трубки колонки.

2.1.2. Качество и эффективность колонок

Качественно заполненные колонки для ВЭЖХ с хорошими стабильными характеристиками имеют высокую стоимость. Это связано с большими сложностями их изготовления. Целесообразно приобретать колонки в фирмах-производителях хроматографических материалов, а не изготавливать их в лабораторных условиях.

Тем, кто работает над простыми аналитическими задачами на низкокэффеkтивных колонках, с принципами и способами заполнения колонок можно ознакомиться, например, в работе [57]. Не существует общепринятой теории процесса упаковки. Общий принцип заполнения заключается в создании суспензии сорбента и введении ее в колонку. При заполнении необходимо избежать разделения частиц по размеру в процессе упаковки. Для этого суспензию стабилизируют,

подбирая смеси растворителей с подходящей вязкостью и другими физико-химическими свойствами, обеспечивающими смачиваемость частиц сорбента, отсутствие агломерации, замедляющими седиментацию. Состав суспензионной жидкости подбирается эмпирически. Если непривитый силикагель хорошо смачивается полярными растворителями (водой, спиртами, ацетоном), а для повышения вязкости в смесь можно вводить циклогексанол, этиленгликоль и глицерин, то при подборе компонентов суспензионной жидкости, при набивке привитых сорбентов следует учитывать их изоляционные свойства, на поверхности частиц гидрофобных сорбентов возникает избыточный заряд, для снятия которого в суспензию добавляют немного электролита, например ацетата натрия. Основным фактором, определяющим качество упаковки, является гидродинамический режим – давление и скорость подачи суспензии. Наиболее часто колонки заполняют методом “удара” при постоянном давлении. Величина давления является критическим параметром, влияющим на качество упаковки. При слишком высоком давлении колонки имеют плохую проницаемость, упакованные при низком давлении колонки имеют высокую проницаемость, однако быстро теряют свою эффективность. Для колонок длиной 100-250 мм и диаметром 3-5 мм оптимальное давление при заполнении равно 20-50 МПа. Обязательная рекомендация – при упаковке тщательно удалять мелкие, пылевидные частицы. Частицы с зернением в 6-7 раз меньше, чем частицы со средним размером, резко ухудшают качество колонки, даже если их доля в сорбенте невелика.

Качество хроматографической колонки характеризуют прежде всего ее эффективностью. Она тем выше, чем уже ширина пика при том же времени удерживания. Эффективность колонки измеряется числом теоретических тарелок N . Чем выше эффективность, тем больше величина N . Другими количественными критериями качества колонки являются H – высота, эквивалентная теоретической тарелке, H' – приведенная высота, эквивалентная теоретической тарелке, и приведенное число теоретических тарелок N' . Дефиниции и формулы для расчетов параметров эффективности колонки приведены в разделе 1.2.

Для типовых качественных колонок для ВЭЖХ N' находится в диапазоне значений 50 – 100 тыс. теоретических тарелок на 1 м.

Если сравнить этот порядок значений с соответствующими значениями, достигаемыми в газовой хроматографии – 2000 т.т. на 1 м для насадочных и 3000 – 4000 т.т. на 1 м для капиллярных колонок, получается, что возможности эффективного разделения в жидкостной хроматографии выше, чем в газовой. Однако в газовой хроматографии можно получить работоспособную колонку с суммарной эффективностью в 1 млн т.т., тогда как в жидкостной хроматографии это пока технически недостижимо. Таковую и более высокую эффективность разделения удастся получить только в методе капиллярного электрофореза.

Значения N , N' , H и H' позволяют сравнивать эффективность колонок разных типов, разной длины, заполненных разными по природе и зернению сорбентами. Сравнивая N двух колонок одной длины, сопоставляют их эффективность. При сравнении H оценивают качество колонок с сорбентами одинакового зернения, но имеющими разную длину. Наконец, величина H' позволяет для двух любых колонок оценить качество сорбента, во-первых, и качество заполнения колонок, во-вторых, независимо от длины колонок, размера частиц сорбента и его природы.

Селективность колонки α , а вернее хроматографической системы в целом, играет большую роль в обеспечении надежного хроматографического разделения. Селективность колонки зависит от многих факторов, варьируя которые можно подобрать оптимальные условия хроматографии заданной смеси компонентов.

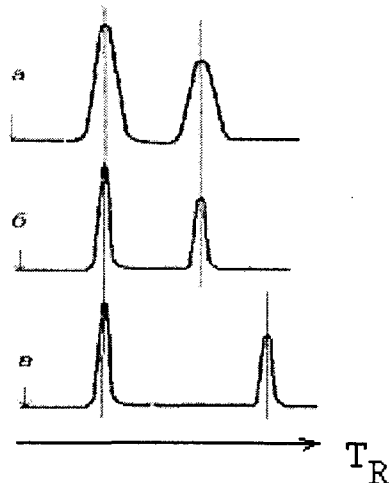


Рис. 2.2. Вид хроматограммы в зависимости от эффективности и селективности хроматографической системы: а – нормальная селективность, пониженная эффективность; б – нормальная эффективность и селективность; в – повышенная селективность, нормальная эффективность

Исходя из химической природы разделяемых компонентов, хроматографист должен выбрать подходящий состав ПФ и соответствующий по химической природе сорбент. Таким образом, селективность колонки всегда относительна. Она зависит от элюента, типа сорбента, определенное влияние на нее имеют и такие термодинамические факторы, как температура и давление в колонке, изменяющие коэффициенты распределения веществ между ПФ и НФ. Подбор оптимальной селективности является обязательным предметом теоретических и практических изысканий хроматографистов при разработке и воспроизведении методик.

Фактор удерживания k , как известно, не зависит от большинства экспериментальных условий, однако на него сильно влияет фазовое отношение (а следовательно, качество упаковки сорбента в колонке).

В первом приближении фактор удерживания k экспериментально определяют по формуле (1.19) как отношение разности времени удерживания конкретного сорбата к времени удерживания несорбируемого соединения. Время выхода несорбируемого соединения t_0 можно выразить величиной, равной длине колонки L , деленной на скорость подвижной фазы u

$$t_0 = L/u \quad (2.1)$$

Уравнение (2.1) показывает, как связано удерживание с равновесием, длиной колонки и линейной скоростью ПФ. Удваивая длину колонки, удваиваем время удерживания, удваивание линейной скорости, напротив, сокращает в 2 раза время удерживания. Через фактор удерживания k время удерживания t_R зависит от относительного количества НФ и ПФ. Термодинамическими факторами, определяющими удерживание являются константа равновесного распределения K и свободная энергия сорбции ΔG .

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (2.2)$$

Чем выше их значение, тем сильнее удерживается вещество на неподвижной фазе.

Константу распределения вещества K_x , выраженную через мольные доли в адсорбированном монослое (полное содержание) и объемном растворе, можно рассчитать по уравнению

$$K_x = X_a/X = 1 + k(V_M/V_a), \quad (2.3)$$

где V_a – объем адсорбционного слоя в колонке, X_a и X – мольная доля сорбата в монослое и ПФ

$$V_a = W_a S_{yo} \delta, \quad (2.4)$$
 где W_a – масса сорбента, S_{yo} – удельная поверхность сорбента, δ – толщина слоя.

Времена удерживания и все производные от них величины являются по существу термодинамическими характеристиками процесса. Однако, как в любом другом физико-химическом процессе, в хроматографии результат определяется совместным влиянием факторов термодинамического и кинетического типа. Если в хроматографической системе данного состава при данной температуре у вещества 1 и 2 значения t_R одинаковы (или $\alpha=1$), то никакое изменение геометрии колонки, расхода ПФ и других параметров не приведет к успешному разделению этой пары компонентов. Различие значений t_R в данном случае также не гарантирует возможности добиться хорошего разделения. Колонка должна обладать высокими кинетическими характеристиками, акты сорбции – десорбции должны совершаться с достаточно быстрой скоростью, чтобы реализовать потенциальную возможность эффективного разделения.

Рассмотрим детальней кинетические характеристики колонки. В ходе хроматографирования в колонке и вне ее по мере прохождения по хроматографическому тракту (дозатор, предколонка, колонка, детектор, коллектор фракций, соединенные друг с другом капиллярами) происходит *размывание узкой концентрационной зоны* введенного вещества. По мере ее движения с подвижной фазой по тракту зона становится все шире, размываясь в результате диффузионных процессов. Эффект размывания характеризуется шириной пика у основания t_w , которую определяют как отрезок, отсекаемый на нулевой линии двумя касательными, проведенными к пику. Если хроматографический пик описывается кривой Гаусса, то $t_w = 4\sigma$, где σ – величина стандартного отклонения, выражаемая в единицах времени. Кривая Гаусса, как известно, в теории вероятностей описывает отклонения от среднего значения некоей величины, подверженной флуктуациям, в частности разброс ошибок измерения. Необходимо отметить, что графическое определение стандартного отклонения на хроматограмме возможно в том случае, если форма пиков соответствует истинно гауссовскому распределению. На практике в большинстве случаев это условие не выполняется.

Ширина пика, как показывают и теория, и практика, увеличивается пропорционально корню квадратному из длины пути, пройденного веществом в колонке.

Мерой размывания полосы вещества в колонке является эффективность, определяемая *числом теоретических тарелок N или высотой, эквивалентной теоретической тарелке, H* .

Размывание хроматографических зон обусловлено в основном тремя следующими причинами:

- 1) Неоднородностью потока по сечению колонки, вследствие которой молекулы разделяемого вещества проходят пути различной длины. Влияние этого эффекта минимально, если колонка равномерно заполнена частицами малого диаметра с узким распределением частиц по размерам:
- 2) Продольной диффузией. Влияние этого вида диффузии в жидкостной хроматографии относительно мало, поскольку коэффициенты диффузии растворителей невелики, и этот эффект становится ощутимым лишь в том случае, если вещество находится в колонке длительное время.
- 3) Диффузией и сопротивлением массопереносу молекул, перемещающихся из одной фазы в другую, и отклонением от состояния равновесия вследствие диффузии. Величина данного эффекта в значительной степени зависит от объемной скорости. Снижение объемной скорости и использование сорбентов с малым размером частиц и открытой пористой структурой (это снижает длину диффузионного пути) уменьшают влияние эффекта. Повышение температуры колонки также уменьшает сопротивление массопередаче, так как увеличивает коэффициенты диффузии и уменьшает вязкость.

Общая величина H колонки выражается суммой вкладов всех этих факторов:

$$H = H_p + H_d + H_s + H_m \quad (2.5)$$

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 массопереносу в подвижной фазе. Чем меньше каждое из четырех слагаемых, тем меньше будет и суммарное значение

H , а следовательно, эффективнее колонка. Величина H_p пропорциональна диаметру частиц сорбента и уменьшается с улучшением равномерности заполнения колонки сорбентом. Величина H_d заметно растет при низком расходе ПФ, что имеет значение в микроколоночной ВЭЖХ на насосах среднего давления. При типовых скоростях элюирования H_d настолько мала, что ею можно пренебречь. Величина H_m уменьшается при ускорении процессов адсорбции – десорбции в НФ, т. е. при использовании частиц малого размера и тонких пленок НФ, при уменьшении скорости потока. Кроме того, величина H_m уменьшается при снижении размера частиц (пропорционально квадрату диаметра частиц), при более равномерном и плотном заполнении колонки сорбентом, уменьшении вязкости ПФ.

Таким образом, к числу основных параметров, контролирующих высоту, эквивалентную теоретической тарелке, относятся: объемная скорость, диаметр частиц сорбента (длина диффузионного пути), характер заполнения колонки, геометрия заполнения и коэффициент диффузии. Иначе говоря, 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.

Что касается размывания концентрационной зоны в таких частях хроматографического тракта, как инжектор, ячейка детектора, микрофильтры для улавливания механических частиц из пробы, устанавливаемые после инжектора, предколонки, капилляры, фитинги и др., оно тем больше, чем больше экстраколоночный объем по сравнению с удерживаемым объемом пика. В современных хроматографах источники дополнительного экстраколоночного размывания тщательно минимизируют.

Вместе с тем следует иметь в виду, что при комплектации хроматографа отдельными блоками, неправильная комбинация инжекторов, детекторов и соединительных капилляров может привести к ощутимой потере эффективности хроматографической системы в целом. От значения *экстраколоночного уширения пика* (ЭКР) зависит как разрешающая способность колонки, так и правильность

оценки N . Большое значение ЭКР имеет при изучении причин, вызывающих размывание хроматографической зоны, а также при оптимизации хроматографической системы. ЭКР служит одним из критериев соответствия колонки и применяемой аппаратуры. Когда ставится задача уменьшения диаметра или длины колонки, повышения N или перехода к сорбентам с меньшим диаметром зерна, необходимо учитывать совместимость колонки и хроматографического тракта. Подчеркнем, что ЭКР можно снизить, уменьшая длину и внутренний диаметр соединительных капилляров, объем кюветы, постоянную времени электронной схемы детектора[51].

Как сказано выше, эффективность колонки зависит от размера частиц сорбента. В большой степени бурное развитие ВЭЖХ в последние годы было обусловлено, во-первых, разработкой способов получения сорбентов с размером частиц от 1.5 до 10 мкм 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, эквивалентна теоретической тарелке $H \approx 2$ при размере частиц 3-10 мкм. В этом случае при стандартной длине колонок 250 мм их эффективность будет составлять от 40 до 12.5 тысяч теоретических тарелок. Наиболее эффективные колонки, заполненные частицами размером 1.5 мкм, требуют очень высокого рабочего давления насоса (до 320 МПа) и относительно низкой скорости потока элюента. При поиске компромиссного решения возникает вопрос о взаимосвязи размера частиц сорбента, эффективности и проницаемости колонок. Уравнение, которое связывает давление, размер частиц и другие важные хроматографические параметры, имеет следующий вид:

$$u = B_0 p / \eta L = p d^2 / \eta \eta L, \quad (2.6)$$

где u – линейная скорость потока, определяемая из уравнения $t_0 = L/u$; B_0 – проницаемость колонки; p – давление; η – вязкость; L – длина ко-

лонки; ψ – фактор сопротивления колонки, d – диаметр частиц сорбента. Фактор сопротивления для колонок, упакованных микрочастицами одного вида по одному и тому же способу, меняется незначительно, он зависит от способа упаковки и формы частиц. Для частиц неправильной формы он выше, чем для частиц сферической формы. Изучение влияния фракционного состава сорбента на B_0 при одинаковом d показало, что даже небольшие добавки мелких частиц резко увеличивают сопротивление. Для фракций широкого состава расчет B_0 вообще теряет смысл. 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.

Согласно (2.6), давление на входе в колонку пропорционально линейной скорости потока, фактору сопротивления колонки, вязкости растворителя и длине колонки, и обратно пропорционально квадрату диаметра частиц. Расчеты показывают, что существуют ограничения возможностей применения мелкодисперсных сорбентов (зернением < 5 мкм) в обращенно-фазовой ВЭЖХ в связи с резким возрастанием противодействия. Для работы с такими сорбентами в режиме ОФХ требуются специальные насосы. Это требование менее критично для НФХ. Проницаемость колонки при прочих равных условиях лимитирует использование больших расходов растворителей, позволяющих сократить время анализа. Современной скоростной ВЭЖХ необходимы насосы, работающие со сверхвысокими давлениями.

При оценке качества колонки зачастую учитывается коэффициент асимметрии A_s (см. раздел 1.2). Предпочтение отдается колонкам, для которых значения A_s лежат в интервале 0.8 – 1.2. Отклонение A_s от 1.0 обусловлено многими факторами, в том числе неравномерным распределением пробы по сечению колонки, наличием мертвых объемов, плохим качеством обработки стенки колонки и др.

Ряд фирм в качестве параметра качества колонки использует стабильность колонки, т. е. воспроизводимость N и A_s при проведении повторных анализов, которые, однако, существенно зависят от ус-

ловий проведения эксперимента. Помимо ухудшения эффективности, проницаемости и симметрии пиков имеется еще и визуально контролируемый признак нестабильности – усадка слоя сорбента ниже верхнего среза колонки. Основная причина проседания сорбента в колонке и потери эффективности – растворение самого силикагеля, даже привитого. Соответственно предлагаются и разные способы предотвращения нестабильности и проседания, например, особый метод заполнения (“вязкостная консолидация”), который позволяет получать высокоэффективные колонки, не проседающие длительное время и сохраняющие при этом нормальную проницаемость.

Для потребителей наиболее очевидными характеристиками приобретаемой или приготовляемой хроматографической колонки являются значения приведенного числа теоретических тарелок N' и величина H' – отношение достигаемой высоты эквивалентной теоретической тарелки к среднему диаметру частицы сорбента. Что касается формы частиц, то и в случае частиц сорбента нерегулярной формы достижимы эффективности не меньшие, чем в случае частиц сферической формы. Это объясняется тем, что частицы нерегулярной формы могут быть упакованы более плотно, чем сферические. Однако при прочих равных условиях колонки, заполненные сферическими частицами, имеют лучшую проницаемость.

2.2. Классификация сорбентов

Если сравнить хроматографическое разделение аналитов с массовым заплывом по реке, в котором участникам разрешается отдыхать на берегу, становится очевидным, что результаты заплыва зависят от того, сколько времени пловцы провели в реке и сколько – на суше, какую среду они предпочитают, насколько доступны берега, каковы извилистость русла, скорость течения и т.д. Рассмотрим особенности одного из важнейших участков этой “реки” – неподвижную фазу (сорбент). Сорбенты, используемые для ВЭЖХ, делят на несколько групп, каждая из которых, в свою очередь, подразделяется на типы. Классификация сорбентов базируется на ряде признаков. В первую очередь сорбенты подразделяют на группы по химической природе матрицы сорбента, далее – по типам и по методу

химической обработки этой матрицы, делающей ее пригодной для использования в определенном варианте хроматографии.

Основными группами сорбентов являются: 1) поверхностно-пористые сорбенты, представляющие собой непроницаемое для растворителя твердое ядро из стекла, на поверхность которого нанесен тонкий слой пористого абсорбента, обычно силикагеля; 2) пористые сорбенты на основе силикагеля; 3) пористые сорбенты на основе оксида алюминия; 4) пористые сорбенты на органической полимерной основе; 4) смешанные сорбенты (неорганические, капсюлированные полимерным слоем, с привитыми ионогенными группами) и неорганические с привитыми органическими группами.

Сорбенты первой группы представляют собой стеклянные микрошарики размером 35-50 мкм, на поверхности которых различными способами закрепляется слой силикагеля или оксида алюминия толщиной в 1-2 мкм. В настоящее время этот тип сорбентов в ЖХ практически не применяется. Единственная область применения, которая для них сейчас осталась, – это использование в предколонках для улавливания необратимо сорбируемых загрязнений из проб, особенно в медицине и биологии. Они легко регенерируются сухим перезаполнением.

Современное поколение сорбентов для ВЭЖХ – микрочастицы диаметром от 1.5 до 10 мкм, главным образом на основе силикагеля и на основе пористых полимеров, реже на основе оксида алюминия. Они могут быть как нерегулярной, так и сферической формы, иметь большую или меньшую степень однородности частиц. Лучшие сорбенты содержат до 90% основной фракции. Диаметр пор d_p может колебаться в зависимости от области применения сорбента от 6 до 10^4 нм, удельная площадь поверхности $S_p = 10-600$ м²/г, удельный объем пор $V_p = 0.3-1.3$ см³/г. В результате реализации большого числа возможных композиций сорбенты для ВЭЖХ достаточно разнообразны, однако во всех случаях к ним выдвигается требование выдерживать высокие рабочие давления в колонке без ухудшения структурных характеристик, т.е. предполагается наличие прочной матрицы.

В качестве сорбентов для ТСХ используют силикагель, силикагели модифицированные алкильными и другими группами, оксид алюминия, целлюлозу и модифицированную целлюлозу, силикат

магния, ионообменные смолы, полиамиды, смеси этих сорбентов и специальные сорбенты, например, для хиральной хроматографии. Диаметр пор $d_p = 6-150$ нм, удельная площадь поверхности $S_p = 300-500$ м²/г, удельный объем пор $V_p = 0.7-1.0$ см³/г.

Сорбенты наносят на стеклянные, алюминиевые, полиэтиленрефталатные или другие полимерные пластины. В качестве связующего вещества для удерживания сорбента на подложке применяют гипс, крахмал, силикаты щелочных металлов и органические клеи. К адсорбенту часто добавляют люминесцентный индикатор для детектирования веществ, поглощающих в УФ области света. Выпускают также двухфазные пластины ТСХ, покрытые двумя адсорбентами. К ним относятся пластины с зоной для концентрирования проб, у которых полоса 2-2.5 см покрыта адсорбционно-неактивным адсорбентом (силикагелем с диаметром пор 500 нм или диатомитом), а остальная часть покрыта обычным силикагелем. Первый слой называется преадсорбционным. Такие пластины широко применяют в биохимии, клинической химии, фармацевтике. Качество ТСХ-анализа на них мало зависит от размера стартового пятна, объема и количества нанесенной пробы, так как нанесенные зоны концентрируются в виде узких полос на границе адсорбентов и далее хроматографируются в виде пятен малого продольного размера.

2.3. Сорбенты для адсорбционной и нормально-фазовой хроматографии

Основным адсорбентом для молекулярной ВЭЖХ является *силикагель*. Этот материал представляет собой почти чистый диоксид кремния SiO₂, однако технические его сорта включают в свой состав те или иные примеси. Силикагель всегда содержит большие или меньшие количества адсорбированной воды (на этом основано его широкое использование в качестве осушителя). Кроме того, технический силикагель содержит другие оксиды, прежде всего оксид алюминия, также железа, который придает техническому силикагелю желтоватый или даже коричневый цвет. Силикагель имеет разную поверхность, составляющую обычно 100-600 м²/г, и значительный объем пор (0.5-1.2 см³/г) с преобладанием пор диаметром от 5 до 15 нм. Силика-

гель получают разными способами, позволяющими варьировать его чистоту и другие свойства. Наиболее общим является метод получения силикагеля из так называемого жидкого стекла, представляющего собой натриевую соль поликремневой кислоты, путем его обработки кислотами с последующим высушиванием образующейся поликремневой кислоты, размолом получающегося кускового силикагеля и выделением нужной фракции рассеиванием. Такой метод используют в первую очередь для получения силикагеля, применяемого в низкоэффективной колоночной и в тонкослойной хроматографии. Другой способ получения силикагелей специально для ВЭЖХ – направленное формование в процессе синтеза силикагеля микросфер нужной фракции с преобладанием частиц размером 3-12 мкм (фирмы “Alltech”, “Dupont”, “Lachema”, “Merck”, “Macherey-Nagel”, “Phenomenex”, “Phase Separation”, “Separations Group”, “Waters”, “Shandon”, и др.) под торговыми марками соответственно адсорбосил, адсорбосфер, альфабонд, зорбакс, инертсил, кромасил, лихросфер, лихросорб, луна, юпитер, нуклеосил, сферисорб, видак, хайперсил. Регулированием процессов формования микросферического силикагеля и его отверждения, сушки и последующей химической обработки получается широкая гамма сорбентов для ВЭЖХ зернением 3, 5, 7 и 10 мкм с узким фракционным составом. Если процесс формования не позволяет получить сразу узкую фракцию микросфер, их подвергают воздушному сепарированию так же, как и размолотый кусковой силикагель. С целью улучшения эффективности, стабильности хроматографических характеристик выпускаемых колонок, улучшения проницаемости в последнее время предпочтение отдается производству более дорогих микросферических сорбентов. Вместе с тем примерно половина применяемых в ВЭЖХ сорбентов имеет нерегулярную форму зерен. В настоящее время разные фирмы производят несколько сотен сорбентов для ВЭЖХ на основе силикагеля как с неправильной формой частиц, так и в виде микросфер. Ассортимент их непрерывно расширяется за счет появления новых привитых фаз к известным силикагелям для ВЭЖХ или же новых вариантов прививки тех же фаз, появления новых силикагелевых матриц с более широкими порами или с очень узкой дисперсией зернения, появления новых фирм-производителей.

Химия поверхности силикагеля для ВЭЖХ независимо от способа его получения примерно одна и та же. На поверхностном слое силикагеля, который работает как адсорбент или же служит той матрицей, к которой прививают химически неподвижную фазу, содержит несколько видов групп, способных к взаимодействию с веществами в процессе хроматографии или в процессе прививки неподвижной фазы (рис. 1.5). Прежде всего, силанольные группы со свободным гидроксилом. Во-вторых, это силанольные группы, свободный гидроксил которых образует с соседним атомом кислорода за счет его неподеленной пары электронов водородную связь, превращаясь в квазиустойчивый шестичленный цикл. В-третьих, это может быть силоксановый мостик, который образуется при высокотемпературной обработке за счет отщепления молекулы воды от двух близлежащих силанольных групп. Последний тип связи в определенных условиях может за счет гидролиза превратиться в две силанольные группы, однако для обычных условий хроматографии процесс дегидратации силоксановых мостиков считается необратимым.

Силикагели могут содержать на поверхности полимолекулярный слой воды, слабоадсорбируемые слои, начиная с 3-го удаляются при комнатной температуре или нагревании до 70°C сухим растворителем, 2-й слой удаляется при 100-120°C сухим растворителем, 1-й слой удаляется при 200-650°C растворителем, однако при температурах выше 450°C начинается процесс дегидратации силанольных групп с образованием силоксановых мостиков.

В табл. 2.1. приведены типичные силикагели для адсорбционной ВЭЖХ и их основные свойства. Следует иметь в виду, что силикагели, имеющие одинаковые диапазоны характеристик, не являются полностью идентичными, даже отдельные партии силикагеля, полученного по одной и той же технологии одной фирмой, имеют некоторые отличительные признаки.

2.4. Привитые сорбенты для нормально-фазовой хроматографии

Сорбенты с химически привитыми фазами на основе силикагеля предлагает практически каждая фирма, производящая сорбенты [281-285]. Функциональные группы прививают по связи =Si-C= . Известно

более 300 привитофазных сорбентов этого типа. Можно отметить следующие преимущества, обеспечивающие преобладающее использование привитых сорбентов на основе силикагеля: механическая устойчивость к высоким давлениям; отсутствие перехода привитой фазы в растворитель в процессе хроматографического разделения (если не протекают реакции, приводящие к химическому отщеплению привитой фазы); устойчивость к действию растворителей, температуры, воды, pH; быстрота установления равновесия при смене элюента, что обеспечивает оперативность работы и возможность работы в градиентном режиме с быстрым возвратом к исходному режиму; возможность варьировать в широких пределах селективность за счет изменения степени прививки, дополнительной химической обработки и замены растворителя. Если в классической газовой хроматографии подвижная фаза практически не оказывает влияния на селективность разделения, то в жидкостной хроматографии ее влияние огромно. Так как в разделии весьма активно участвуют как привитая фаза, так и адсорбированные (абсорбированные) компоненты подвижной фазы, широкий ассортимент сорбентов для ВЭЖХ в большинстве случаев не нужен. Изменением состава подвижной фазы зачастую удается добиться той же селективности, что и за счет применения нового дорогостоящего привитофазного сорбента. Достаточно иметь в комплекте лаборатории 3-4 сорбента и широкий ассортимент растворителей и добавок разного типа. Наиболее распространены привитые алкиламинные ($\equiv\text{Si}-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, возможна вторичная или третичная аминогруппа), алкилдильные ($\equiv\text{Si}-(\text{CH}_2)_3\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$) и алкилнитрильные ($\equiv\text{Si}-(\text{CH}_2)_3\text{CN}$) фазы.

Алкилнитрильную, алкиламинную и алкилдильную привитые фазы можно использовать в разных вариантах хроматографии. Прежде всего они могут быть применены для работы с неполярными растворителями типа гексан – 2-пропанол, где они проявляют свойства, близкие к свойствам силикагеля без привитой фазы. Однако их селективность отличается от селективности силикагеля, что позволяет подобрать наилучший сорбент для каждого анализа. Кроме того, их преимуществом перед силикагелем является более быстрое уравнивание с подвижной фазой, и это позволяет использовать их при работе с изменением состава элюента в процес-

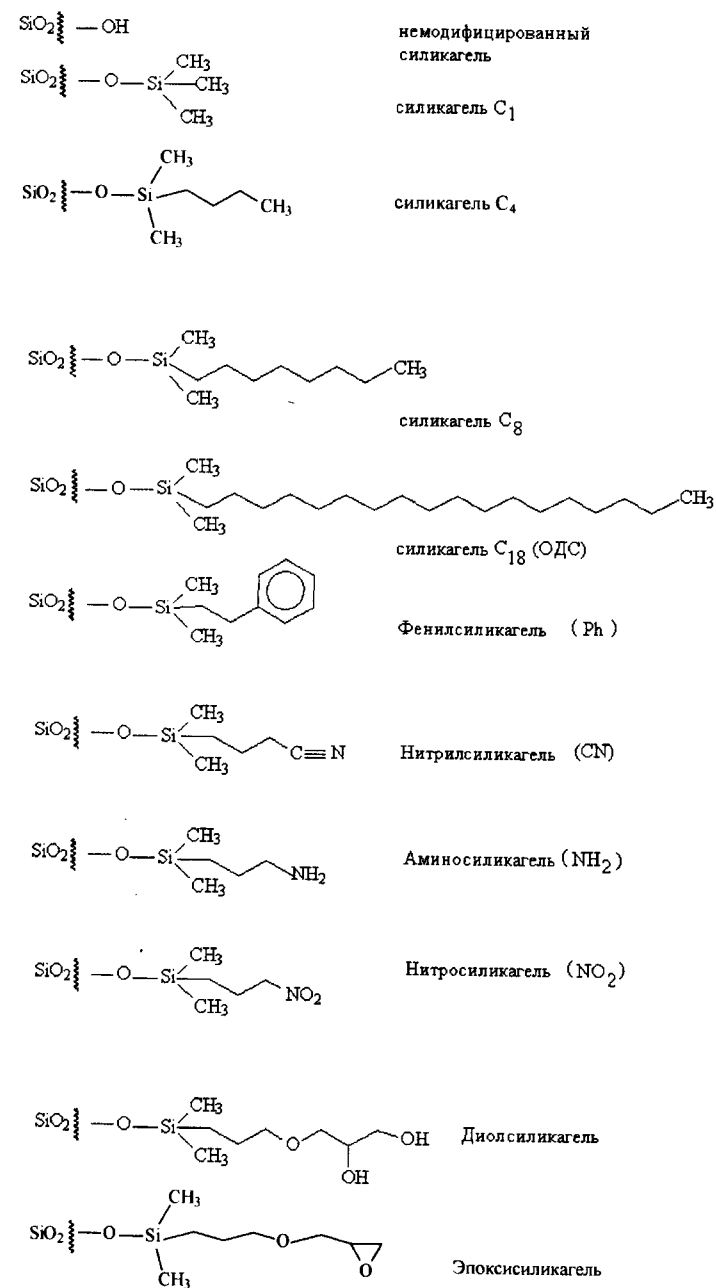


Таблица 2.1. Немодифицированные силикагели для ВЭЖХ

Сорбент	$S_p, \text{м}^2/\text{г}$	$d_p, \text{нм}$	$V_p, \text{см}^3/\text{г}$	pH водной суспензии	Форма частиц
Адсорбосил	450	6	-	-	Нерегулярная
Адсорбсфер	200	8	-	-	Сферическая
Адсорбсфер	350	6	-	-	//-
Армсил	300-360	10	0.9	6.5-7.5	Нерегулярная
Армсфер	300	10	0.9	6.0-7.5	Сферическая
Бондапак	300	10	-	-	Нерегулярная
Видак	100	30	-	-	Сферическая
Видак	500	8	-	-	//-
Гиперсил	170	10; 30	0.6-0.7	9.0	Сферическая
Диасорб-130	300-330	11	0.9	-	Нерегулярная
Динамакс 60А	350	6	-	-	//-
Динамакс 150 А	-	15	-	-	//-
Динамакс 300 А	-	30	-	-	Сферическая
Зорбакс	350	7	0.5	3.9	//-
Лихросорб 60	320	6; 10	1.2	7.0	Нерегулярная
Лихросорб 100	320	6; 10	1.2	7.0	//-
Лихросфер 100	350	10	1.2	7.0-7.5	Сферическая
Макросфер	300-500	6-400	-	-	Нерегулярная
Матрекс 60	500; 300	6; 15	0.75-1.1	6.5-7.5	//-
Матрекс 100	500; 300	6; 15	0.75-1.1	6.5-7.5	//-
Микросорб	300	10	-	-	Сферическая
Нуклеосил	25-2500	5-100	0.7-1.0	-	//-
Партисфер	160	12	-	-	Сферическая
Партисил	350	8.5	-	7.0	Нерегулярная
Полигосил 60	500-300	6; 10	0.75-1.0	-	//-
Полсил	300	14	-	-	//-
Порасил	350	10	1.1	7.2	//-
Резольв	350	9	-	-	Сферическая
РоСил	400	8	0.7	-	//-
РСил	550	6	-	7.0	Нерегулярная
Сепарон	450	15	0.8	-	//-
Силасорб 300	300-500	7.5; 10	0.7-1.0	-	Сферическая
Силасорб 600	300-500	7.5; 10	0.7-1.0	-	//-
Силикагель КСК	250-350	12-15	1.0-1.25	-	Нерегулярная
Синхропак	60-50	6-400	-	-	Сферическая
Супелкосил	170	30	1.3	-	//-
Сферисорб	220	8	0.6	9.5	//-
Ультрасил	-	12	-	-	Нерегулярная
Ультрасфер	-	12	-	-	Сферическая
Унисфер	300	10	-	6.5-7.5	//-
Хромосфер	100	12	0.7	-	//-
Эконосфер	200-250	8-10	-	-	//-
Эконосил	450	6	-	-	//-
Эрбасил	300	5	0.1	-	Нерегулярная

Таблица 2.2. Свойства сорбентов для НФХ с привитой фазой

Сорбент	$S_p, \text{м}^2/\text{г}$	$d_p, \text{нм}$	d, мкм	Форма частиц
Адсорбосил CN	450	6	5,10	Нерегулярная
Адсорбосфер CN	200	8	3,5,10	Сферическая
Адсорбосфер NH ₂	200	8	3,5,10	//-
Аллтима CN	-	10	5,10	//-
Аллтима NH ₂	-	10	5,10	//-
АльфаБонд CN	300	12.5	10	Нерегулярная
АльфаБонд NH ₂	300	12.5	10	//-
м-Бондапак CN	300	10	-	//-
м-Бондапак NH ₂	300	10	-	//-
Версапак CN	200	60	10	//-
Версапак NH ₂	200	60	10	//-
Видак TP501 CN	100	30	10	Сферическая
Гиперсил ЦПС (CN)	170	10	3,5,10	//-
Гиперсил АПС (NH ₂)	170	10	3,5,10	//-
Диасфер-130-Нитрил	300-330	11	5,7,10	//-
Диасфер-130-Диол	300-330	11	5,7,10	//-
Диасфер-130-Амин	300-330	11	5,7,10	Нерегулярная
Зорбакс CN	350	7	8	Сферическая
Зорбакс NH ₂	350	7	8	//-
Лихросорб NH ₂	300	10	10	Нерегулярная
Лихросорб Диол	300	10	10	//-
Лихросорб CN	300	10	5,10	//-
Луна CN	300	10	3	Сферическая
Луна Фенил-Гексил	300	-	5	//-
Нуклеосил CN	300	10	5,10	//-
Нуклеосил NH ₂	300	10	5,10	Сферическая
Нуклеосил N(CH ₃) ₂	300	10	5,10	//-
Нуклеосил NO ₂	300	10	5,10	//-
РоСил NH ₂	400	8	3,5,8	//-
РСил CN	550	6	6,10	Нерегулярная
РСил NH ₂	550	6	6,10	//-
РСил NO ₂	550	6	6,10	//-
Сепарон CN	300	10	5,10	Сферическая
Сепарон NH ₂	300	10	5,10	//-
Силасорб CN	300	10	5,7,10	Нерегулярная
Силасорб NH ₂	300	10	5,7,10	//-
Силасорб Диол	300	10	5,7,10	//-
Сферисорб Амин	220	8	5, 10	Сферическая
Сферисорб Нитрил	220	8	5, 10	//-
ТечСил Амин	500	6	5,10	Нерегулярная

Сорбент	S_p , м ² /г	d_p , нм	d, мкм	Форма частиц
ТечСил NO ₂	500	6	5,10	-//-
ТечСил Нитрил	500	6	5,10	Нерегулярная
Эконосил CN	450	6	5,10	-//-
Эконосил NH ₂	450	6	5,10	Нерегулярная
Эконосфер CN	200	8	5,10	Сферическая
Эконосфер NH ₂	200	8	5,10	-//-

се анализа, т. е. с градиентом состава подвижной фазы. Они также менее чувствительны к влиянию воды. При использовании аминок-фазы следует избегать хроматографирования сорбатов, содержащих альдегидные и кетонные группы, так как они могут образовывать с аминокгруппами сорбента шиффовы основания.

Ниже приведены некоторые структуры модифицированных силикагелей, которые производятся практически всеми фирмами, специализирующимися на выпуске хроматографических материалов и колонок. При ознакомлении с каталогами сорбентов или готовых колонок следует обращать внимание на то, что за фирменным названием модифицированного силикагеля следует указание функциональной группы, выраженное либо в непосредственном названии группы, либо в виде химических символов, или в виде общепринятого сокращения. Например, в названиях “Адсорбосил CN” и “Адсорбосфер CN” приведена формула модифицирующей функциональной группы – нитрильной. Суффикс *-сил*, или приставка *сила-* обычно указывает на то, что сорбент изготовлен из силикагеля, суффикс *-сфер* или приставка *сфери-* в названии сорбента подчеркивает, что форма частиц в сорбенте сферическая. Так, по названию сорбента “Сферисорб ОДС” можно заключить, что частицы силикагеля сферические и что он модифицирован октадецильной группой ($-C_{18}$). По названию “Лихросфер РП-18” можно догадаться, что это сорбент со сферическими частицами модифицирован октадецильной группой. Аббревиатура “РП (RP)” – означает обращенную фазу (reversed phase).

2.5. Сорбенты для обращенно-фазовой хроматографии

Модифицированными сорбентами с химически привитыми группами, используемыми в обращенно-фазовой жидкостной хромато-

графии, являются силикагели, на поверхности которых по связям – Si-C- ковалентно привиты алкильные группы C_2-C_8 , октадецильные группы C_{18} , фенильные, алкиламино-, amino-, нитро- и диольные группы. Наиболее вероятные механизмы реакций взаимодействия силикагеля с модификатором приведены в [13,57,113,131-133].

Наиболее распространенными в практике ОФХ хроматографии из указанных сорбентов являются октадецильные фазы (C_{18}). Плотность прививки составляет 1.1-2.3 нм². Привитые сорбенты разных производителей отличаются как по типу модификатора, так и по концентрации органического модификатора и концентрации оставшихся после прививки силанольных групп на поверхности силикагеля. Содержание углерода в сорбентах составляет 5-20%. Степень покрытия поверхности силикагеля органическим модификатором обычно составляет 10-60%. В лучших случаях степень покрытия достигает 95%. Наличие остаточных силанольных групп приводит к тому, что адсорбционный и ионообменный механизмы удерживания всегда сопутствуют обращенно-фазовому. Для уменьшения числа силанольных групп сорбенты зачастую дополнительно обрабатывают триметилхлорсиланом. Такую обработку называют эндкеппингом (end capping). Размер пор S_p модифицированных сорбентов находится в пределах 150-550 м²/г. Удерживание и селективность сорбентов, несмотря на идентичность модифицирующих групп, варьируют достаточно сильно. Причинами невоспроизводимости являются различия в свойствах исходных силикагелей и условий модифицирования. Современные разработки фирм направлены на уменьшение вариативности свойств выпускаемых сорбентов. В табл. 2.2 приведены характеристики сорбентов двойного назначения, а в табл. 2.3 представлены типичные обращенно-фазовые сорбенты.

Недостатками обращенно-фазовых сорбентов на основе силикагеля являются ограниченно допустимый диапазон pH и сорбционная активность остаточных силанольных групп. С этим недостатком в результате качественного эндкеппинга и других усовершенствований удастся справиться лидеру по производству колонок нового поколения американской фирме “Феноменекс” (например, одна из наиболее популярных обращенно-фазовых колонок в мире – Луна C18 – обладает стабильностью в диапазоне значений pH 1,5 – 10). Их

Таблица 2.3. Свойства сорбентов для ОФХ с привитой фазой

Сорбент	S_p , м ² /г	d_p , нм	d, мкм	Форма частиц
Адсорбосил С ₈	450	6	5,10	Нерегулярная
Адсорбосил С ₁₈	450	6	5,10	—/—
Адсорбсфер С ₈	200	8	3,5,10	Сферическая
Адсорбсфер С ₁₈	200	8	3,5,10	—/—
Аллтима С ₈	—	10	5,10	—/—
Аллтима С ₁₈ NUC	—	10	5,10	—/—
АльфаБонд С ₈	300	12.5	5,10	Нерегулярная
АльфаБонд С ₁₈	300	12.5	10	—/—
м-Бондапак С ₁₈	300	10	10	—/—
м-Бондапак Фенил	300	10	10	—/—
Версапак С ₈	200	60	10	—/—
Версапак С ₁₈	200	60	10	—/—
Видак ТП201 С ₁₈	100	30	10	Сферическая
Видак Дифенил	100	30	10	—/—
Гиперсил С ₈	170	10	3,5,10	—/—
Гиперсил ОДС (С ₁₈)	170	10	3,5,10	—/—
Зорбакс С ₈	350	7	8	—/—
Зорбакс ОДС	350	7	8	—/—
Диасорб-130-С1	300-330	11	5,7,10	Нерегулярная
Диасфер-130-С4	300-330	11	5,7,10	Сферическая
Диасфер-130-С8	300-330	11	5,7,10	—/—
Диасфер-130-С18Т	300-330	11	5,7,10	—/—
Диасфер-130-Фенил	300-330	11	5,7,10	—/—
Лихросорб РП-18	300	10	5,7,10	Нерегулярная
Лихросорб РП-8	300	10	10	—/—
Лихросорб РП-2	500	6	5,10	—/—
Лихросфер РП-18	300	10	5	Сферическая
Луна С18	300		3,5	—/—
Луна С5	100		5	—/—
Луна С8	300		5	—/—
Нуклеосил С ₁₈	300	10	3,5,7,10	—/—
Партисил ОДС-1	400	5	10	Нерегулярная
Партисил ОДС-2	400	5	10	—/—-я
Партисил ОДС-3	400	5	5,10	—/—-я
РоСил С ₁₈	400	8	3,5,8	Сферическая
РоСил С ₈	400	8	3,5,8	—/—
РоСил Фенил	400	8	3,5,8	Сферическая
РСил С ₁₈ ХЛ	550	6	6,10	—/—
РСил С ₈	550	6	6,10	—/—

продолжение Таблицы 2.3.

Сорбент	S_p , м ² /г	d_p , нм	d, мкм	Форма частиц
РСил Фенил	550	6	6,10	—/—
Сепарон С ₁₈	300	10	5,10	Сферическая
Сепарон С ₈	300	10	5,10	—/—
Силасорб С ₁₈	300	10	5,7,10,15,20	Нерегулярная
Силасорб С ₈	300	10	5,7,10,15,20	—/—
Силасорб С ₂	600	7	5,7,10,15,20	—/—
Сферисорб ОДС	220	8	5, 10	Сферическая
Сферисорб С ₈	220	8	5, 10	—/—
ТечСил С ₁₈	500	6	5,10	Нерегулярная
ТечСил С ₈	500	6	5,10	—/—
Эконосил С ₁₈	450	6	5,10	—/—
Эконосил С ₈	450	6	5,10	—/—
Эконосфер С ₁₈	200	8	5,10	Сферическая
Эконосфер С ₈	200	8	5,10	—/—
Юпитер С5	300		5	—/—
Юпитер С18	300		5,10	—/—
Юпитер С4	300		5,10,15	—/—

лишены также полимерные сорбенты PRP-1 (Polymer Reversed Phase) фирмы "Гамильтон". Эти сорбенты представляют собой жесткий стирол-дивинилбензолный гель, $S_p=415$ м²/г, $V_p=0.79$ см³/г, $d_p=7.5$, размер частиц 5,10 мкм. По селективности сорбент аналогичен октадецильным силикагелям, в то же время работоспособен при pH=1-13 и концентрации буферных солей до 0.5-1 М.

Фирма "Шова Денко" выпускает на основе различных пористых полимеров сорбенты RS-пак серии D, в частности, DS-613, DE-613, DM-614, устойчивые при pH=2-12, характеризующиеся полной адсорбционной инертностью и высокой разделяющей способностью.

По гидрофобным свойствам сорбент DS-613 аналогичен полимерному сорбенту PRP-1 и силикагелям с октадецильной привитой фазой. Материалы DE-613, DM-614 и DC-613 изготавливают на базе полиметилметакрилата, гидрофильного сложного полиэфира и полистирола с гидрофильными заместителями. Они по гидрофобности занимают промежуточное положение между сорбентами с С₈- и NH₂-фазами и могут применяться как в обращенно-фазовом, так и в нормально-фазовом варианте ВЭЖХ.

Как видно из табл. 2.3, практически все производители сорбентов выпускают привитые обращенные фазы C_{18} и C_8 , причем в нескольких вариантах, с разной плотностью прививки. Что касается NO_2 - и NH_2 -фазы, то их применение в ОФХ основано на том, что они имеют короткий алифатический мостик (C_3), связывающий полярную группу с поверхностью силикагеля. Полярная группа не участвует в разделении по обращенно-фазовому механизму или играет второстепенную роль, несколько изменяя селективность для веществ с определенной химической структурой.

2.5.1. Обращенно-фазовые сорбенты для работы на водных подвижных фазах

Одной из основных проблем, связанных с эксплуатацией обращенно-фазовых колонок, являются невозможность использования 100% водного элюента, а следовательно и трудности при разделении высокополярных органических соединений, например, карбоновых кислот или некоторых водорастворимых витаминов. 100% водный элюент не проникает в поры привитого сорбента, при этом резко уменьшается контакт анализируемых соединений с неподвижной фазой, что ведёт, в свою очередь, к катастрофическому снижению времён удерживания (рис. 2.3).

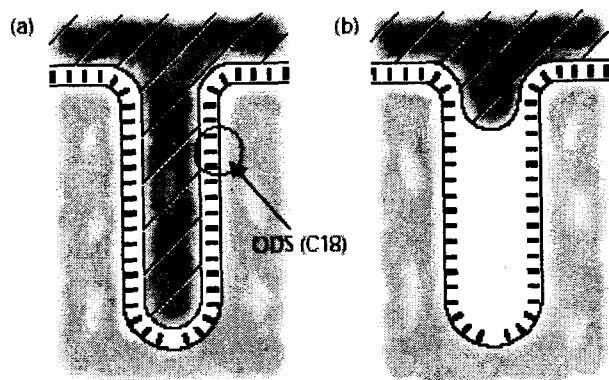


Рис. 2.3. Взаимодействие водно-органического элюента (а) и водного элюента (б) с порами силикагеля C_{18}

Таблица 2.4. Торговые марки обращенно – фазных колонок с “полярной вставкой” для работы на водных подвижных фазах

Торговая марка	Производитель	Функциональная группа	“Полярная вставка”
Ace AQ	Advanced chromatography technologies	C18	-
Chromegabond ODS-PI	ES Industries	C18	Мочевина
Discovery Amide	Supelco	C18	Амид
HydroBond AQ	Mac-Mod Analytical	-	-
Inertsil Embedded Polar	GL Science	-	-
Kromasil Amide C8	Eka Chemicals	C8	Амид
Maccel AQPS C18	Nest Group	C18	-
Nucleosil 100-3 Protect I	Macherey-Nagel	-	-
Pinnacle IBD	Restek	C18	-
Polaris C18-и C8-Ether	Ansys Technologies	C8, C18	Эфир
Polaris-A	Ansys Technologies	C8, C18	-
Prism RP18	Thermo Hypersil - Keystone	C18	
ProntoSil C18 ACE-EPS	Bischoff Chromatography	C18	
ProTec	ES Industries	C8, C18	Амид
Quest Advance	Thermo Hypersil - Keystone	C8	Амид
RTF C18	Whatman	C18	Амид
Stability-BS-C23	Cluzeau-Info-Labo	C18	Амин
Supelcosil ABZ+	Supelco	C18	Амид
SymmetryShield RP18	Waters	C8, C18	Карбамат
Synergi Polar-RP	Phenomenex	Фенил	Эфир
Zorbax Bonus- RP	Agilent Technologies	C14	Амид

Несмотря на то, что в ряде случаев от обычной колонки C_{18} можно добиться приемлемой стабильности в условиях 100% водной подвижной фазы (размер пор должен превышать 22 нм, рабочая температура колонки должна быть ниже 10 °С или 5мМ ион парного реагента должно быть добавлено в элюент), последние несколько лет ознаменовались появлением на мировом хроматографическом рынке целого ряда специфических обращённо-фазовых колонок, предназначенных для разделения высокополярных соединений с применением подвижных фаз с высоким содержанием воды. Самой распространённой разновидностью таких колонок являются колонки с так называемой “полярной вставкой”. В них полярные функциональные группы такие как, амидная, карбаматная или эфирная, вводятся в алкильную цепочку привитой фазы как можно ближе к поверхности силикагеля. Изначально колонки с “полярной вставкой”, в частности амидной, использовались благодаря своей способности деактивировать взаимодействия остаточных силанольных групп с основными компонентами пробы. Впоследствии была обнаружена способность данного типа колонок к стабильной работе в условиях водных подвижных фаз (даже при работе на 100% водном элюенте привитая фаза находится в смоченном состоянии, а алкильные цепи сохраняют конформационную подвижность и способность взаимодействовать с компонентами пробы), а также улучшенная селективность по отношению к полярным соединениям. На рис.2.4. схематично изображена рабочая

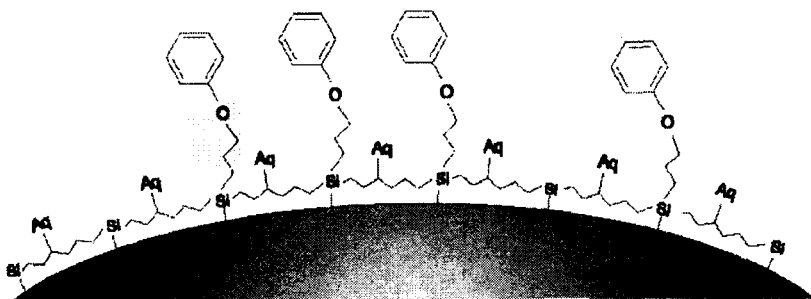


Рис. 2.4. Рабочая поверхность сорбента Синерджи Полар-РП (Феноменекс, США) с полярной вставкой в виде эфирной группы

поверхность сорбента колонки Синерджи Полар-РП (Феноменекс, США), являющейся характерным представителем колонок с эфирной группой в качестве “полярной вставки”. В таблице 2.4. перечислены основные марки колонок с “полярной вставкой”, присутствующие на современном хроматографическом рынке.

Ещё одним типом сорбентов, способным к воспроизводимой работе на 100% водных элюентах, являются сорбенты с полярным энд – кэппингом. Отличительной чертой таких сорбентов является использование полярных энд – кэппирующих реагентов вместо триметилхлорсиланов, используемых при модификации традиционных обращённо – фазовых сорбентов. Благодаря наличию полярных групп на поверхности сорбента, он смачивается водой и обеспечивает полное взаимодействие с разделяемыми компонентами. К сожалению, химическая структура полярных энд – кэппирующих групп держится в секрете большинством производителей. В таблице 2.5. приведены торговые марки колонок с применением техники полярного и гидрофильного энд – кэппирования нескольких производителей. В качестве примера возможностей обращённо – фазовых колонок с полярным энд – кэппингом на рисунке 2.5. приведена хроматограмма смеси полярных органических кислот, полученная на колонке Synergy Hydro RP (Феноменекс, США).

Таблица 2.5. Торговые марки обращённо – фазных колонок с применением техники полярного или гидрофильного эндкэппинга для работы на водных подвижных фазах

Торговая марка	Производитель	Функциональная группа
Alltima AQ	Alltech Associates	C18
Aqua	Phenomenex	C18
Aquasil C18	Thermo Hypersil - Keystone	C18
HydroBond PS	Mac-Mod Analytical	C8, C18
MetaSil AQ	Ansys Technologies	C18
Nucleosil 100-S Nautilus	Macherey-Nagel	C18
Polarity dC18	Waters	C18
ProntoSIL C18 AQ Plus	Bischoff Chromatography	C18
Synergy Hydro RP	Phenomenex	C18

В ряде случаев анализируемое соединение настолько полярно, что добавление даже 5% органического модификатора в подвижную фазу приводит к выходу данного соединения с мёртвым объёмом на обычной C18 колонке. Повышение гидрофобности неподвижной фазы обеспечивает достаточное количество гидрофобных взаимодействий и увеличивает удерживание полярных соединений. Так называемые колонки “с длинной алкильной цепью” (C27 – C30) не только обеспечивают более сильное удерживание полярных и гидрофобных соединений по сравнению с традиционными C8 и C18 колонками, но и обладают большей рН стабильностью за счёт сильного экранирования поверхности силикагеля длинными алкильными цепочками, а главное, более устойчивы при работе с водными подвижными фазами. Последнее свойство связано, вероятно, с конформационными изменениями в неподвижной фазе, происходящими при температурах, близких к температурам плавления углеводородных лигандов. Так, температура плавления C18 – лиганда ($C_{18}H_{38}$) составляет 29 – 30 °С, а температура плавления C30 –

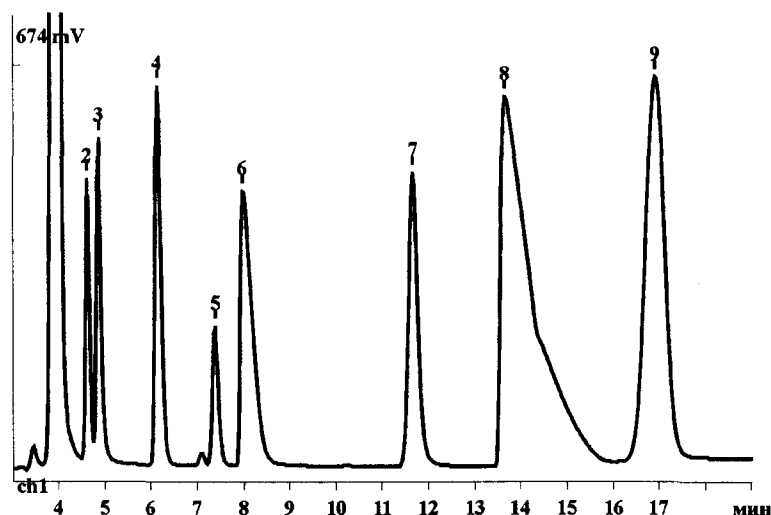


Рис. 2.5. Хроматограмма смеси органических кислот. Условия разделения: колонка Synergy Hydro RP, 4μ, 250 × 4.6 мм, элюент- 20 мМ фосфат калия, рН 2.9, расход: 0,8мл/мин, длина волны детектирования 220 нм. Кислоты: 1-шавелевая, 2-винная, 3-муравьиная, 4-малоновая, 5-аскорбиновая, 6-примесь, 7-яблочная, 8-примесь, 9-янтарная

Таблица 2.6. Торговые марки обращённо – фазовых колонок с длинными алкильными цепочками

Торговая марка	Производитель	Функциональная группа
Advantage C30 Altocarb	Analytical Sales and Services	C30
Develosil C30-UG-5	Nomura Chemical	C30
Hicarbosphere	HPLC Technology	C30
MetaChem C30	Ansys Technologies	C30
PrincetonSpher-C27	Princeton Chromatography	C27
ProntoSil C30	Bischoff Chromatography	C30
Triacontyl-Si 100	Serva Electrophoresis GmbH	C30
YMC Pack C30	YMC	C30

лиганда ($C_{30}H_{62}$) – 68 – 69 °С. Следовательно, при стандартной рабочей температуре (30 – 40 °С) фаза C30 находится в твёрдом состоянии и устойчива в водных условиях, а фаза C18 – в жидком, её лиганды более подвижны и, как следствие, менее устойчивы к воздействию водных элюентов. В табл. 2.6 приведены некоторые торговые марки колонок с длинными алкильными цепочками.

Несмотря на то, что C8 и C18 фазы нашли самое широкое применение в обращённо – фазовой хроматографии, иногда перед аналитиком встаёт задача осуществить сложное разделение, достичь которое на традиционных фазах не представляется возможным. Выходом из создавшейся ситуации могут служить новые обладающие уникальной селективностью, фторированные фазы. Фторированные

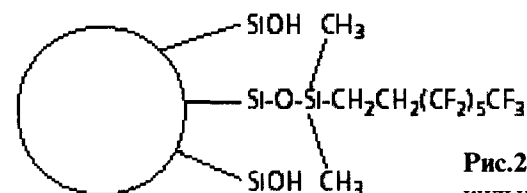


Рис.2.6 Структура типичной алкильной фторированной фазы на основе перфтороктил-1Н, 1Н, 2Н, 2Н-диметилхлорсилана

Таблица 2.7 Фторированные фазы для обращённо-фазной хроматографии

Торговая марка	Фирма-производитель	Удельная поверхность, м ² /г	Размер пор, Å	Химическая структура фазы
Curosil PFP	Phenomenex	-	-	Перфторфенил
Discovery F5 HS	Supelco	-	120	Перфторфенил
Fluophase RP	Thermo Electron	310	100	Неразветвлённый перфторгексил
Fluophase WP	Thermo Electron	100	300	Неразветвлённый перфторгексил
Fluophase PFP	Thermo Electron	310	100	Перфторфенил
Fluofix 120E	Thermo Electron	-	120	Разветвлённый перфторгексил
Fluofix 300 E	Thermo Electron	-	300	Перфторгексил
FluoroSep-RP Phenyl	ES Industries	350	60	Пентафторфенил
FluoroSep-RP Octyl	ES Industries	450	60	Пентафтороктил
Chromegabond LS	ES Industries	-	180	Перфторалкильная цепочка
FluoroSep-RP Phenyl HS	ES Industries	450	60	Пентафторфенил
FluoroSep-RP Propyl	ES Industries	120	300	Перфторпропил
MacroSep HPR	ES Industries	-	300	Перфторалкильная цепь
Chromegabond PFP/T	ES Industries	350	60	Пентафторфенилпропильная группа
FluoroSep-RP Phenyl Plus	ES Industries	-	120	Пентафторфенилалкильная цепь
Allure PFP Propyl	Restek	-	60	Пентафторфенилпропильная группа
Ultra PFP	Restek	-	100	Перфторфенил
TAC-1	Whatman	-	159	Пентафторфенилпропильная группа
Chromegabond FSP Plus	ES Industries	-	120	Перфторфенилпропильная группа
MacroSep Fluoroalkyl	ES Industries	-	1000	Короткая перфторалкильная цепь
MacroSep FSP	ES Industries	-	300 & 1000	Перфторфенил

неподвижные фазы, присутствующие на современном хроматографическом рынке, содержат либо алкильные цепи различной длины, либо фенильные группы. Многие из фторированных фаз с алкильной цепью содержат как фторированные, так и немодифицированные метиленовые группы, причём последние находятся, как правило, у основания привитой алкильной цепочки максимально близко к поверхности силикагеля и служат для стабилизации алкильной цепи (см. рис. 2.6). Фторированные фенильные фазы содержат, как правило, пентафторфенильную группу, привитую к силикагелю через короткую алкильную группу (чаще пропильную). В основе механизма разделения на фторированных фазах лежат стерическое распознавание, перенос заряда и $\pi - \pi$ взаимодействия. Фторированные неподвижные фазы могут быть использованы для разделения сложных смесей токоферолов, таксанов или геометрических изомеров каротина. В таблице 2.7 приведён перечень большинства фторированных фаз для обращённо – фазовой хроматографии.

2.6. Сорбенты для ионообменной хроматографии

В ионообменной хроматографии применяют разнообразные сорбенты, используемые как для разделения аминокислот, белков, нуклеотидов, гетероциклических оснований, так и для разделения неорганических ионов [57, 138-149]. Эти сорбенты можно разделить на два основных вида: ионообменные смолы и силикагели с химически привитой фазой, обладающей ионообменными свойствами. В предколонках используют также третий тип – пелликулярные (поверхностно-плёночные) сорбенты. Применяемые в ВЭЖХ ионообменные смолы, как правило, являются сополимерами стирола и дивинилбензола, к которым привиты ионные функциональные группы. Синтетические смолы являются гелями, матрица которых состоит из сети пространственно закреплённых между собой углеродных цепей. С матрицей жестко соединены фиксированные ионы, несущие заряд и придающие смоле свойства ионообменника. Твёрдость и механическая прочность сополимера стирола и дивинилбензола также зависит от степени сшивки, т.е. от процентного содержания дивинилбензола. Ионообменная смола с высокой степе-

нюю сшивки, содержащая 8-30% дивинилбензола, способна не изменять объем в различных растворителях и выдерживать большие давления без сжатия (усадки). Такие смолы пригодны для хроматографии малых ионов, а смолы с низкой степенью сшивки (2-4%) применяют для хроматографии макромолекул. Обычно ионообменные смолы представляют собой микропористые сферические частицы диаметром менее 10 мкм, диаметр пор $d_p = 5-10$ мкм. Сульфогруппы придают им способность к катионному обмену (сильные катионообменные группы), а триалкиламмониевые – к анионному (сильные анионообменные группы). Они обладают приемлемой эффективностью и высокой ионообменной емкостью. Емкость различных смол колеблется от 0.5 до 10 ммольэкв/г.

Для обозначения сильных ионообменников применяют символ S (strong), а для слабых – W (weak). Интересны ионообменные хелатные смолы, которые могут связывать ионы некоторых металлов, образуя с ними комплексы более прочные, чем с ионами других металлов.

Силикагелевая основа делает материал более прочным, практически исключается проблема набухания или усадки сорбента. Материал устойчив к любым буферным растворам, растворителям и высоким температурам (до 80 °C). Однако сильноокислотные или слабоосновные растворы ($2 < \text{pH} < 7,5$) могут привести к разрушению силикагелевой основы. Как правило, эффективность, полученная на привитых ионообменниках, сравнима с эффективностью обращенно-фазовых материалов одинакового зернения. Коммерческие ионообменные силикагели различаются по структуре пор и по типу присоединенной функциональной группы, по общей поверхности пор и форме частиц. Активные группы вводят сульфированием, хлорметилированием и последующим аминированием. Даже если поверхность силикагеля полностью покрыта кремнийорганическими соединениями, остается большое число непрореагировавших поверхностных ОН-групп, которые ведут себя как слабые кислоты в ионообменном процессе. К силикагелю прививают кислотные карбокси- и сульфодиолгруппы, основные амино-, алкиламиногруппы и амфотерные аминоксидрокси- или аминоксидгруппы. Обычно силикагель обрабатывают фенилтрихлорсиланом, затем сульфатируют олеумом или хлорсульфоно-

Таблица 2.8. Свойства ионообменных смол для ВЭЖХ

Наименование	Размер частиц, мкм	Функциональная группа	Ионообменная емкость (в сухом состоянии), ммольэкв/г	Степень сшивки, %
Альтекс ОА-1000	12	$-(\text{SO}_3)^-$	-	-
Альтекс Анион НС	12	$-(\text{NH}_3)^+$	3	-
Аминекс А-27	12-15	$-(\text{NH}_3)^+$	3.2	8
Аминекс А-28	7-11	$-(\text{NH}_3)^+$	3.2	8
Аминекс А-27	6-9	$-(\text{NH}_3)^+$	3.2	8
AN-X	11	$-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{Cl}^-$	4	2, 4, 8, 12
Аминекс А-5	11-15	$-(\text{SO}_3)^-$	5	8
Аминекс А-7	7-11	$-(\text{SO}_3)^-$	5	8
Аминекс А-8	5-8	$-(\text{SO}_3)^-$	5	8
Аминекс А-9	11-12	$-(\text{SO}_3)^-$	5	8
Бекман АА-15	11	$-(\text{SO}_3)^-$	5	8
Бекман АА-20	11	$-(\text{SO}_3)^-$	5	8
Гамильтон НА	7-10	$-(\text{NR}_3)^+\text{Cl}^-$	5	4, 6, 8, 10
Гамильтон НС	7-10	$-(\text{SO}_3)^-$	5.2	2-35
Даррум ДС А	14	$-(\text{SO}_3)^-$	5	8
Даррум ДС 6А	11	$-(\text{SO}_3)^-$	5	8
Ионекс SB	5-20	$-(\text{NR}_3)^+\text{Cl}^-$	3	7
Ионекс SA	10	$-(\text{SO}_3)^-$	3	8
Ионопак	10	$-(\text{SO}_3)^-$	3-5	-
Сферон ДЕАЕ	10, 16, 20	$-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	1.5	-
Сферон микро C300	10, 16, 20	$-\text{COOH}$	2.0	-
Сферон В300	10, 16, 20	$-(\text{SO}_3)^-$	1.5	-
Хромекс	11-12	$-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$	4	2, 4, 8, 12
Хромекс Катион	11	$-(\text{SO}_3)^-$	4	8, 12

вой кислотой. Силикагели с привитыми группами делятся на микро- и макропористые в зависимости от диаметра внутренних пор. Микропористые материалы, имеющие небольшие по диаметру поры, позволяют молекулам растворителя, например воды, а также небольшим ионам проникать в полимерную матрицу, но задерживают объемные молекулы. Большинство полимерных ионообменных силикаге-

Таблица 2.9. Свойства ионообменных силикагелей для ВЭЖХ

Наименование	Размер частиц, мкм	Функциональная группа	Ионообменная емкость (в сухом состоянии), ммольэкв/г
Адсорбосфер SAX	5,10	$-(\text{SO}_3)^-$	<1
Адсорбосфер SCX	5,10	$-(\text{NH}_3)^+$	<1
Видак TP Анион	10	$-\text{[N(CH}_3)_3]^+$	<1
Видак TP Катион	10	$-(\text{SO}_3)^-$	<1
Зорбакс SAX	6	$-(\text{NR}_3)^+$	<1
Зорбакс SCX	10	$-(\text{SO}_3)^-$	1.0
Лихросорб AN	10	$-(\text{NR}_3)^+$	0.55
Лихросорб КАТ	10	$-(\text{SO}_3)^-$	1.2
Нуклеосил SB	5, 10	$-\text{[N(CH}_3)_3]^+ \text{Cl}^-$	1.0
Нуклеосил SA	5,10	$-(\text{SO}_3)^-$	1.0
Макросфер Амино	3, 5, 10	$-(\text{NH}_3)^+$	<1
Макросфер 300	5, 10	$-(\text{NH}_3)^+$	<1
Макросфер 300	5, 10	$-(\text{SO}_3)^-$	<1
Макросфер AX	5,10	$-\text{N(C}_2\text{H}_5)_2$	<1
Макросфер CX	5, 10	$-\text{COOH}$	<1
Партисил SAX	10	$-(\text{NR}_3)^+ (\text{H}_2\text{PO}_4)^-$	<1
Партисил SCX	10	$-(\text{SO}_3)^- (\text{NR}_4)^+$	<1
Рсил Анион	5, 10, 15	$-\text{[N(CH}_3)_3]^+$	<1
Синхропак AX	3	$-\text{COOH}$	<1
Сферисорб AX	10	$-(\text{NH}_3)^+$	<1

лей имеют микроструктуру. Полимерные смолы макропористого типа используют преимущественно в жидкостной хроматографии низкого давления. Макропористые и макросетчатые ионообменные смолы на основе полистирольных и полиакрилатных полимеров с большими дискретными порами, заключенными в жесткую структуру оптимальны для анализа белков. Макропористые силикагели с привитыми ионообменными группами также можно применять при разделении макромолекул биополимеров, например, белков.

При работе с ионообменной смолой, состоящей из мелких частиц, быстрее достигается равновесное состояние, повышается эффективность данного объема смолы, лучше разделение. Высокая эффективность зависит также от разброса размеров частиц смолы. Для

Таблица 2.10. Катионообменные смолы для колоночной хроматографии

Наименование	Полимер*, степень сшивки, %	Функциональная группа	Размер частиц**, мкм	Обменная емкость набухшей смолы, мэкв/мл	Максимальная рабочая Т, °С
AG 50 W-X4 (Дауэкс 50 W-X4)	СТ-ДВБ, 4	$-\text{SO}_3^-$	СС 37-74, 74-149	1.2	150
AG 50 W-X8 (Дауэкс 50 W-X8)	СТ-ДВБ, 8	$-\text{SO}_3^-$	СС 37-74, 74-149	1.7	150
AG 50 W-X12 (Дауэкс 50 W-X12)	СТ-ДВБ, 12	$-\text{SO}_3^-$	СС 37-74, 74-149	2.3	150
AG 50 W-X16 (Дауэкс 50 W-X16)	СТ-ДВБ, 16	$-\text{SO}_3^-$	СС 37-74	2.6	150
Амберлит IR-120	СТ-ДВБ, 8	$-\text{SO}_3^-$	НС 297-1126	1.9	120
Амберлит CG-120	СТ-ДВБ, 8	$-\text{SO}_3^-$	СС 30-66, 66-149	1.9	120
Дуолит 225	СТ-ДВБ, 4, 8, 12	$-\text{SO}_3^-$	НС 297-1126, 149-297	1.4	120
Дуолит 26С	МП, высокая	$-\text{SO}_3^-$	НС 297-1126	1.8	140
Амберлит CG-50	ПМА-ДВБ, 5	$-\text{COO}^-$	СС 30-66, 66-149	3.5	120
Дуолит 436	ПМА-ДВБ, 5	$-\text{COO}^-$	НС 297-1126	3.7	100
Биорекс 70	МС, 10	$-\text{COO}^-$	СС 66-149, 149-297, 297-841	1.8	140

*) СТ-ДВБ – полистирольная смола, поперечно-сшитая дивинилбензолом; ПМА-ДВБ – полиметакриловая кислота, поперечно-сшитая дивинилбензолом; ПАА – полиалкиленаминовая кислота; МП – макропористая смола; МС – макросетчатая смола.

**) НС – набухающая смола, СС – сухая смола; размер частиц в мкм определяли по числу меш (стандарт США) из табл. 2.13.

колоночного разделения рекомендуются частицы размером < 100-200 меш (149-66 мкм). Более грубые сорта пригодны в основном для обессоливания и других неколоночных операций. Объемная емкость ионообменной смолы зависит не только от концентрации ионизируемых групп, но и от степени ионизации. Если ионообменники, несущие сильнокислотные или сильноосновные группы, эффективны в широком диапазоне pH, то слабокислотные и слабоосновные смолы имеют более узкий рабочий диапазон pH, зависящий от величины pK_a функциональной группы.

Фирмами Whatman Chemical Separation (Великобритания), Bio-Rad Laboratories (США), Serva Feinbiochemica (ФРГ), Farmacia Fine Chemicals (Швеция) выпускаются ионообменники на основе целлюлозы (смолы целлекс, сервацел, сефацел и др.), поперечно-сшитые диэпоксидами. Смолы имеют вид или целлюлозных волокон, обработанных таким образом, чтобы исключить мелкие порошкообразные частицы. Размер волокон может колебаться в широких пределах.

Второй тип – микрогранулированная целлюлоза, в которой цилиндрические гранулы стандартизированы, однородны по размеру, что улучшает их хроматографические характеристики. Наконец, микрогранулированной целлюлозе придают форму шариков. Из поперечно-сшитых декстранов (сефадекс) или агароз (сефароза CL, биогель А) получают ионообменники для гель-фильтрации. Эти материалы двойного назначения обладают небольшой обменной емкостью к молекулам, превышающим по своим размерам предел эксклюзии, который варьирует в зависимости от pH и ионной силы, что придает процессу гель-фильтрации не характерные для него вторичные эффекты.

Сефадексы (Farmacia Fine Chemicals, Швеция) серии G – весьма гидрофильные, набухающие в водной среде гели, имеют различную степень сшивки, размер пор и интервалы фракционирования. Устойчивы при pH = 2-12 в присутствии мочевины, детергентов и в органических растворителях. Сефадексы серии LH получают из сефадексов типа G-25 или G-50 путем гидроксипропилирования. Аналогичны по устойчивости серии G, применяются в сочетании как с водными, так и водно-органическими подвижными фазами. Биогель P (Bio-Rad Laboratories) – носители в виде сферических гранул из

Таблица 2.11. Анионообменные смолы для колоночной хроматографии

Наименование	Тип полимера*, степень сшивки, %	Функциональная группа	Размер частиц**, мкм	Обменная емкость набухшей смолы, мэкв/мл	Максимальная рабочая T, °C
AG 1-X4 (Дауэкс 1-X4)	СТ-ДВБ, 4	- [N(CH ₃) ₃] ⁺	CC 37-74, 74-149	0.7	50 (ОН), 150 (Cl ⁻)
AG 1-X8 (Дауэкс 1-X8)	СТ-ДВБ, 8	- [N(CH ₃) ₃] ⁺	CC 37-74, 74-149	1.4	50 (ОН), 150 (Cl ⁻)
AG MP-1	МП	- [N(CH ₃) ₃] ⁺	CC 297-841, 74-149, 37-74	1.2	
Амберлит IRA-400	СТ-ДВБ, 8	- [N(CH ₃) ₃] ⁺	HC 297-1126	1.4	60 (ОН), 77 (Cl ⁻)
Амберлит CG-400	СТ-ДВБ, 8	- [N(CH ₃) ₃] ⁺	CC 74-149	1.4	60 (ОН), 77 (Cl ⁻)
Дуолит 113	СТ-ДВБ, 7-9	- [N(CH ₃) ₃] ⁺	HC 297-841	1.3	60 (ОН), 60 (Cl ⁻)
AG 2-X8 (Дауэкс 2-X8)	СТ-ДВБ, 8	- [N(CH ₃) ₂ C ₂ H ₄ OH] ⁺	CC 37-74, 74-149	1.4	30 (ОН), 150 (Cl ⁻)
AG 2-X10 (Дауэкс 2-X10)	СТ-ДВБ, 10	- [N(CH ₃) ₂ C ₂ H ₄ OH] ⁺	CC 74-149	1.4	30 (ОН), 150 (Cl ⁻)
Амберлит IRA-410	СТ-ДВБ, 8	- [N(CH ₃) ₂ C ₂ H ₄ OH] ⁺	HC 297-1126	1.4	40 (ОН), 77 (Cl ⁻)
Дуолит A116	СТ-ДВБ	- [N(CH ₃) ₂ C ₂ H ₄ OH] ⁺ -(NR ₃) ⁺	HC 297-1126	1.4	35 (ОН), 75 (Cl ⁻)
Биорекс 5	ПАА	- [N(CH ₃) ₂ C ₂ H ₄ OH] ⁺	CC 74-149	2.8	60 (ОН), 60 (Cl ⁻)
Дуолит A303	СТ-ДВБ, 7-9	-NR ₂ -(NH ₃) ⁺	HC 297-1126	1.3	70 (ОН), 70 (Cl ⁻)
Дуолит A378	МП	-NR ₂ -(NH ₃) ⁺	HC 297-1126	1.6	60 (ОН), 100 (Cl ⁻)

Наименование	Тип полимера*, степень сшивки, %	Функциональная группа	Размер частиц**, мкм	Обменная емкость набухшей смолы, мэкв/мл	Максимальная рабочая Т, °С
AG 3-X4A (Дауэкс 3-X4A)	СТ-ДВБ, 4	-NR ₂	СС 74-149	1.9	65(OH), 65 (Cl)
Амберлит IR-45	СТ-ДВБ	-NR ₂	НС 297-1126	1.9	100 (OH), 100 (Cl)
Амберлит IRA-67	ПМА-ДВБ	-NR ₂	НС 300-1126	1.6	75 (OH), 75 (Cl)
Амберлит IRA-93	МС	-NR ₂	НС 297-1126	1.4	100 (OH), 100 (Cl)

*) СТ-ДВБ – полистирольная смола, поперечно-сшитая дивинилбензолом; ПМА-ДВБ – полиметакриловая кислота, поперечно-сшитая дивинилбензолом; ПАА – полиалкиленаминовая кислота; МП – макропористая смола; МС – макросетчатая смола.

**) НС – набухшая смола, СС – сухая смола; размер частиц в мкм определяли по числу меш (стандарт США).

полиакриламида, продукта сополимеризации акриламида и N,N'-метиленбисакриламида. Устойчив в органических растворителях, но во многих из них не набухает, что ограничивает его применение в этих растворителях. Биогель А – носитель сферической формы на основе геля агарозы. Совместим со всеми обычными буферными растворами, устойчив при pH=4-10. Сефароза (Farmacia Fine Chemicals) – носитель на основе геля агарозы с небольшим числом заряженных групп, устойчив при pH=9-14, чувствителен к замораживанию и нагреванию выше 40°C. Зачастую носители на основе гелей агарозы поставляются в набухом состоянии.

2.7. Сорбенты для эксклюзионной хроматографии

Разделение в этом варианте ЖХ, основными объектами которого являются полимеры, а главной аналитической задачей – определение характеристик полидисперсности высокомолекулярных веществ, практически целиком основано на ситовом эффекте [177-185]. Тип сорбента, в первую очередь, определяется растворимос-

тью анализируемых веществ в воде и органических растворителях. В зависимости от этого выбирают хроматографию в водных системах или в органических растворителях. Разделение веществ низкой и средней полярности в органических растворителях осуществляют как на полужестких, так и на жестких гелях. Исследование молекулярно-массового распределения (ММР) гидрофобных полимеров, содержащих полярные группы, чаще всего проводят на колонках со стиролдивинилбензольными 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 или полужесткие гели специальных типов. Затем по калибровочным кривым или данным о диапазоне фракционирования 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 молекулярно-массовом диапазоне используют наборы из нескольких колонок с сорбентами различной пористости. Ориентировочно калибровочную зависимость в этом случае получают сложением кривых для отдельных сорбентов. Особое значение в эксклюзионной хроматографии придают линейной зависимости логарифма молекулярной массы полимера от удерживаемого объема. В этом случае можно рассматривать хроматограмму как зеркальное отображение дифференциальной кривой ММР в логарифмическом масштабе сорбента.

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

К растворителям, применяемым в эксклюзионной хроматографии, предъявляют определенные требования: они должны полностью растворять образец при температуре разделения; смачивать

поверхность сорбента и не ухудшать эффективность колонки; предотвращать адсорбцию разделяемых веществ на поверхности сорбента; обеспечивать максимально высокую чувствительность детектирования; иметь низкую вязкость и токсичность.

Растворимость образца обычно является главным лимитирующим фактором, ограничивающим ассортимент пригодных ПФ. Наилучшим органическим растворителем для эксклюзионной хроматографии синтетических полимеров по комплексу свойств является ТГФ. Он обладает уникальной растворяющей способностью, низкой вязкостью и небольшой токсичностью, лучше многих других растворителей совместим со стиролдивинилбензольными гелями (СТ-ДВБ) 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. 1,2-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, например, 1,3 г/л 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенола (ионола).

Жесткие сорбенты совместимы с любыми подвижными фазами, имеющими $pH < 8-8,5$; при более высоких значениях pH силикагель начинает растворяться и колонка необратимо теряет эффективность. Гели на основе СТ-ДВБ совместимы в основном с элю-

ентами умеренной полярности. Для работы на колонках с μ -стирогелем ($\geq 1000 \text{ \AA}$) пригодны тетрагидрофуран, арены, галогеналканы, 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 \AA и 500 \AA) такая усадка наблюдается как в полярных, так и в неполярных растворителях, поэтому с ними, кроме того, нельзя работать в алканах, фторированных спиртах и ДМФА. 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 – ТГФ, толуолом, хлороформом и ДМФА.

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.

Значительно более сильными модификаторами являются этиленгликоль и полигликоли с различной молекулярной массой (ПЭГ-200, ПЭГ-400, карбовакс 20 М) [57]. Иногда, например, при анализе поликислот в ДМФА, требуется добавка достаточно силь-

Таблица 2.12. Сорбенты для эксклюзионной хроматографии

Сорбент	Основа	d_p , нм	Подвижная фаза	Диапазон проницаемости
Аквагель	Полиакриламид	-	неводная	$100-10^5$
Биогель Р-2	Полиакриламид	-	водная	200-2000
Биогель Р-4	Полиакриламид	-	---/---	800-4000
Биогель Р-10	Полиакриламид	-	---/---	1500-20000
БиоСеп-SEC-S 2000	-	15	---/---	$1 \cdot 10^3 - 1 \cdot 10^4$
БиоСеп-SEC-S 3000	-	29	---/---	$5 \cdot 10^3 - 6 \cdot 10^4$
БиоСеп-SEC-S 4000	-	50	---/---	$1 \cdot 10^5 - 4 \cdot 10^5$
Лихросфер Si-100	Силикагель	10	---/---	$1000-7 \cdot 10^4$
Лихросфер Si-500	Силикагель	50	---/---	$5 \cdot 10^3 - 5 \cdot 10^5$
Лихросфер Si-1000	Силикагель	100	---/---	$1 \cdot 10^4 - 3 \cdot 10^6$
Сефадекс G-25	Полисахарид	-	---/---	100-5000
Сефадекс LH-20	Полисахарид	-	неводная	100-4000
Сефадекс G-75	Полисахарид	-	водная	$3 \cdot 10^3 - 8 \cdot 10^4$
Сефадекс G-100	Полисахарид	-	водная	$1000-15 \cdot 10^4$
μ -Стирагель 100E	СТ-ДВБ	10	неводная	10-700
μ -Стирагель 500E	СТ-ДВБ	50	---/---	$500-1 \cdot 10^4$
μ -Стирагель 1000E	СТ-ДВБ	100	---/---	$1000-2 \cdot 10^4$
μ -Стирагель 10^4 E	СТ-ДВБ	1000	---/---	$1 \cdot 10^4 - 20 \cdot 10^4$
μ -Стирагель 10^5 E	СТ-ДВБ	10000	---/---	$1 \cdot 10^5 - 2 \cdot 10^6$
μ -Сферогель 50E	СТ-ДВБ	5	---/---	50-2000
μ -Сферогель 100E	СТ-ДВБ	10	---/---	$100-5 \cdot 10^3$
μ -Сферогель 500E	СТ-ДВБ	50	---/---	$500-1 \cdot 10^4$
μ -Сферогель 10^3 E	СТ-ДВБ	100	---/---	$1 \cdot 10^3 - 5 \cdot 10^4$
μ -Сферогель 10^4 E	СТ-ДВБ	1000	---/---	$1 \cdot 10^4 - 5 \cdot 10^5$
μ -Сферогель 10^5 E	СТ-ДВБ	10000	---/---	$1 \cdot 10^5 - 5 \cdot 10^6$
TSK-гель G1000H	СТ-ДВБ	-	---/---	$50-5 \cdot 10^3$
TSK-гель G2000H	СТ-ДВБ	-	---/---	$1 \cdot 10^3 - 1 \cdot 10^4$
TSK-гель G2500H	СТ-ДВБ	-	---/---	$2 \cdot 10^3 - 2 \cdot 10^4$
TSK-гель G3000H	СТ-ДВБ	-	---/---	$5 \cdot 10^3 - 6 \cdot 10^4$
TSK-гель G4000H	СТ-ДВБ	-	---/---	$1 \cdot 10^5 - 4 \cdot 10^5$
TSK-гель G2000 PW	Полимерный гель	-	водная	$1 \cdot 10^3 - 5 \cdot 10^3$
Шодекс А-801/S	СТ-ДВБ	-	неводная	10-1000
Шодекс А-803/S	СТ-ДВБ	-	---/---	$200-7 \cdot 10^4$
Шодекс KF-801	СТ-ДВБ	-	---/---	100-1500
Шодекс KF-803	СТ-ДВБ	-	---/---	$100-7 \cdot 10^4$

ных кислот. Следует отметить, что полностью устранить адсорбцию добавкой модификаторов удастся не всегда. В таких случаях рекомендуют полужесткие гели. Некоторые полимеры хорошо растворяются только в высоко полярных растворителях (ацетон, ДМСО и т. п.), несовместимых с гелями на основе СТ-ДВБ. 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, полисахариды, полиэлектролиты и др.) и разнообразия применяемых сорбентов существует много вариаций состава подвижной фазы для подавления различных нежелательных эффектов. Общими приемами модификации являются добавка различных солей и применение буферных растворов с определенным значением pH. В частности, поддержание $pH \leq 4$ дает возможность подавить слабую ионообменную активность силикагелей, обусловленную присутствием на их поверхности кислых силанольных групп. Требуемая ионная сила подвижной фазы достигается при концентрации буферного раствора 0,05-0,6М. Для предотвращения ионообменной сорбции катионных соединений наиболее часто используют такой активный модификатор, как тетраметиламмонийфосфат при $pH \approx 3$. 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 ПФ вводят полярные органические растворители, полигликоли, кислоты, основания и поверхностно-активные вещества. Примеры материалов для эксклюзионной хроматографии приведен в табл. 2.12.

2.8. Специальные сорбенты

Наряду с сорбентами широкого спектра применения разработаны и выпускаются специализированные сорбенты, например, хиральные сорбенты для разделения рацемических смесей энантио-

меров (“сорбенты Даванкова”), нуклеотидов и нуклеозидов, олигонуклеотидов и РНК, биополимеров и вирусов [152-164,280].

Сорбенты с хиральными фазами для разделения энантиомеров в их рацемических смесях получены как на основе хиральных смол, так и на основе силикагеля с привитыми динитробензоилпроизводными фенилглицина и лейцина (электроноакцепторная серия сорбентов) и с привитыми производными нафтилаланина (электронодонорная серия сорбентов). В [152] приведены данные по хелатообразующим микросетчатым полистирольным смолам с привитыми α -аминокислотами и хиральным фазам на основе силикагеля. Для анализа смесей лекарственных препаратов в биологических жидкостях без удаления из сыворотки пептидов выпускают бифункциональные “сорбенты Пинкертонa”, внешняя поверхность которых гидрофилизирована и не удерживает соединений, а внутренняя гидрофобизирована. Основа сорбента – силикагель. Привитая фаза – трипептид глицилфенилаланилфенилаланин. Молекулы белков не проникают внутрь глобул, лекарственные препараты проникают внутрь пор сорбента и разделяются.

Что касается специальных сорбентов для аффинной хроматографии, специфически взаимодействующих с белками или другими биологическими молекулами, они представляют собой носители с лигандами, иммобилизованными с помощью ковалентных связей. Например, фермент может взаимодействовать с иммобилизованным субстратом или аналогом субстрата, иммобилизованный лектин взаимодействовать с углеводным остатком гликопротеина или рецепторный белок со своим специфическим лигандом. Для элюирования абсорбированного белка можно использовать специфические элюенты, например, лиганд или его аналог, или неспецифические факторы такие, как концентрация соли или pH. Сорбенты для аффинной хроматографии обычно состоят из трех ковалентно-связанных компонентов: нерастворимого носителя, “ножки” (*спейсера*) и специфического лиганда. Наиболее часто используемый носитель – это зернистая 4%- и 6%-ная агароза, которая может быть стабилизирована поперечным сшиванием эпихлоргидрином, дивинилсульфонем или бисэпоксидом (бисоксираном). Носитель на основе целлюлозы обычно используется для олигонуклеотидных лигандов, на-

пример олиго-dT-целлюлоза. В числе других часто используемых носителей – поперечно-сшитый декстран, полиакриламид, гидроксиалкилметакрилатные полимеры и модифицированные силикагели. Если низкомолекулярный лиганд присоединять непосредственно к носителю, возникающие стерические эффекты могут препятствовать взаимодействию лиганда со специфичным белком. Чтобы предотвратить это, между носителем и лигандом вводится *спейсер*. Для этой цели обычно используют углеводородные цепи, содержащие 6 или 8 атомов углерода, при этом лиганд удаляется от матрицы на расстояние 0.5-1.0 нм, но иногда используются и более длинные углеводородные цепи длиной до 17 атомов углерода. Углеводородные спейсеры могут влиять на адсорбцию некоторых макромолекул, вступая в гидрофобные взаимодействия с ними; в связи с этим в некоторых случаях предпочтительнее использовать спейсеры, содержащие гидрофильные группы. Если лиганд – макромолекула, например, белок, то обычно нет необходимости в спейсере, макромолекулярный лиганд можно закрепить непосредственно на твердом носителе. В качестве *лиганда* может быть использована любая молекула, низкомолекулярная или высокомолекулярная, способная специфически взаимодействовать с белком, нуклеиновой кислотой или другой молекулой, которую нужно хроматографически отделить. Многие лиганды такие, как субстраты ферментов, лектины или антигены, взаимодействуют только с одним типом белка или по крайней мере с очень ограниченным кругом белков. Другие такие, как коферменты (NAD, NADP), нуклеотиды (ATP, AMP, cAMP и т. д.) и иммобилизованные красители, специфически взаимодействуют с более широким, хотя и ограниченным кругом макромолекул и известны как группоспецифические лиганды. В настоящее время доступен широкий набор иммобилизованных лигандов [280].

Для получения аффинного сорбента носитель активируют с помощью того или иного реагента, способного образовать ковалентную связь с активной группой лиганда. Например, агарозу активируют карбонилдидимидазолом или бромочианом CNBr и за счет аминогруппы лиганда присоединяют его к гелю.

Из нуклеотидов в качестве лигандов применяют ATP, ADP, 5'-AMP, 2'-AMP, 3',5'-cAMP, 2',5'-ADP, 3',5'-ADP, dATP, Ap₃A, адено-

зин, CTP, CDP, 5'-CMP, GTP, GDP, 5'-GMP, 7-метил-GTP, UTP, UDP, 5'-UMP, UDP-глюкуроновая кислота. Наиболее распространенный способ присоединения через C₆-гидразидный спейсер, взаимодействующий с альдегидными группами, образующимися в результате периодатного окисления рибозного остатка в нуклеотидах. Имеются также сорбенты со спейсерами различной длины, к которым присоединены адениннуклеотиды через N-6 аминогруппу или C-8. В некоторых сорбентах присоединение осуществляется к *n*-аминофенольному спейсеру через фосфатную группу. Олигонуклеотиды полинуклеотиды (олиго-dT, олиго-dA, олиго-dC, олиго-dG, олиго-dl, ДНК природная и денатурированная, поли-гА, поли-гС, поли-гG, поли-гI, поли-гU) присоединяются через 5'-фосфатную группу к целлюлозному носителю или к агарозному носителю.

Коферменты (NAD, NADP, FMN, CoA, HMG-CoA, биотин, дезтиобиотин, иминобиотин) присоединяются через N-6 аминогруппы, C-8 или окисленный периодатом рибозный остаток аденина. CoA может связываться через тиольную группу или иметь свободную -SH. Биотин и его аналоги обычно присоединяют к спейсеру через карбоксильную группу боковой цепи.

Все 20 L-аминокислот, найденных в белках, D-аргинин, D-фенилаланин, D-триптофан, L-тироксин, глутатион (восстановленный и окисленный), гексил-GSH, сульфобромомфалеин-S-GSH. 5-гидрокситрип-тамин, гистамин, спермин, цистеамин, пепстатин присоединяются непосредственно к CNBr-активированной агарозе через аминогруппу. Некоторые аминокислоты присоединяются к носителю через спейсер.

Белков и лектины также присоединяются непосредственно к CNBr-активированной агарозе через аминогруппу. Иммуноглобулины, белок А (*Staph. aureus*), авидин (мономер или тетрамер), ингибитор трипсина (бобы сои и римской фасоли), кальмодулин, парвальбумин, желатин, гемоглобин, овальбумин, α-лактальбумин, протамин, инсулин и многие ферменты могут быть иммобилизованы в мягких условиях на CNBr-активированной агарозе или агарозе, активированной другим методом.

Углеводы (D-ксилоза, L-фруктоза, D-глюкоза, D-галактоза, D-манноза, D-глюкозамин, N-ацетил-D-глюкозамин, D-галактоза-

мин, N-ацетил-D-галактозамин, D-лактоза, D-мелибиоза, D-мальтоза, гепарин) обычно присоединяют по гликозидной (или тиогликозидной) связи к *p*-аминофенольному спейсеру или гликозидамидной связью спейсеру на основе аминоксепановой кислоты. В обоих этих типах присоединения необходимо точно устанавливать конфигурацию сахара у C-1 (α или β). Другие способы иммобилизации включают присоединение через гидроксил при C-6 к эпокси-активированной агарозе, присоединение через C-1 к дивинилсульфоновому спейсеру и присоединение аминсахаридов через аминогруппу к спейсеру на основе аминоксепановой кислоты. Аффинные сорбенты с углеводными лигандами обычно получают путем присоединения спейсеров к сахариду, а уже затем вводят полученные соединения в реакцию с активированной агарозой.

Наряду с упомянутыми лигандами иммобилизуют красители, имеющие большое сродство к некоторым ферментам, гидрофобные лиганды, кислоты, специфически сорбирующие полиолы и углеводы.

2.9. Диаметр частиц и размер в мешах

Для жидкостной хроматографии разных направлений используемые сорбенты отличаются не только материалом, поверхностной модификацией, но и размерами зерен сорбента. Эффективные размеры частиц приводят или в микрометрах, нм или в мешах. Величина зернения в мешах определяется по числу отверстий на дюйм самого тонкого сита, через которое могут пройти зерна. Номера сита (ситовые шкалы), принятые метрологическими службами за стандарт в различных странах различаются (см. табл. 2.9.) [135]. В колоночной хроматографии обычно применяют сорбенты с зернением 80-200 меш (стандарт США), в планарной хроматографии >250 меш. Однородность зерен по размерам (малый разброс в мешах) характеризует высокое качество сорбента, так как обеспечивает лучшую набивку колонок и более эффективное разделение при прочих равных условиях.

Таблица 2.13. Ситовые шкалы

Размер отверстия, мкм	Номер сита, меш			
	США	Великобритания	Япония	Германия, Франция
4000	5			
2000	10	8	9.2	34
841	20	18	20	
800				30
595	30	25	28	
500				28
420	40	36	36	
400				27
315				26
297	50	52	48	
250	60	60	55	25
210	70	72	65	
200				24
177	80	85	80	
160				23
149	100	100	100	
125	120	120	120	22
105	140	150	145	
100				21
88	170	170	170	
80				20
74	200	200	200	
63	230	240	250	19
53	270	300	280	
50				18
44	325	350	325	
40				17
37	400			

ГЛАВА 3.

ПРОФИЛЬ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ТРАКТА

3.1. Аппаратура для жидкостной хроматографии

Наиболее существенным в развитии хроматографического приборостроения за последние 15 лет является радикальное повышение надежности конструкций хроматографов за счет усовершенствования аппаратуры и материалов, из которых она изготовлена, автоматизация ввода пробы, режимов элюирования, детектирования и обработки результатов, разработка высокочувствительных детекторов разнообразных типов. Наблюдается устойчивое увеличение выпуска жидкостных хроматографов. Более 125 фирм во всем мире серийно производят жидкостные хроматографы 5-го поколения. Каждая вторая клиника в США в качестве одного из методов анализа использует жидкостную хроматографию. В настоящее время значительно расширился рынок сбыта ЖХ за счет применения их в биотехнологии, для охраны окружающей среды и санитарно-эпидемиологических исследований. Темпы прироста рынка ЖХ составляет более 10% в год. Более 800 фармацевтических фирм применяют ЖХ для доказательства нетоксичности своей продукции. Растет применение ЖХ в судебной и спортивной медицине, для диагностики анаболиков, наркотиков, антибиотиков, витаминов и различных болезней человека [19-21,32,51, 57, 236].

Самыми распространенными хроматографическими системами являются системы, имеющие модульный принцип сборки. Насосы, дегазирующие устройства, детекторы, дозаторы (автосамплеры), термостаты для колонок, коллекторы фракций, блоки управления хроматографической системой и регистрирующие устройства выпускаются в виде отдельных модулей. Широкий выбор модулей позволяет гибко решать различные аналитические задачи, быстро менять при необходимости конфигурацию системы с минимальными расходами. Вместе с тем выпускаются и мономодульные (интегрированные) ЖХ, главным преимуществом которых является миниатюризация отдельных блоков, компактность прибора.

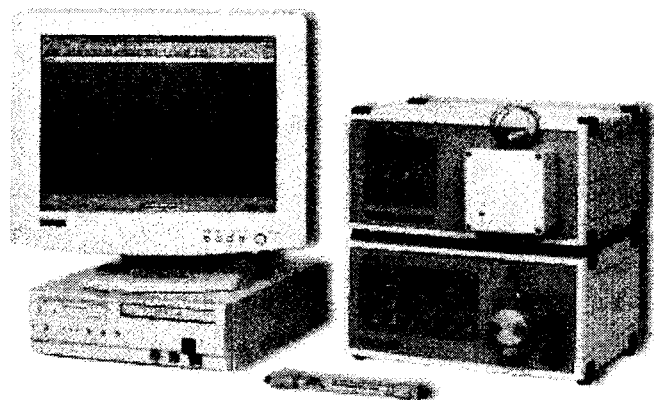


Рис. 3.1. Стандартная хроматографическая система “Стайер CD” в минимальной комплектации (ЗАО “НПКФ Аквилон”, Россия)

3.2. Насосы

Для создания потока чистого растворителя или смеси растворителей (элюента) используют насосы, входящие в гидравлическую схему хроматографа. Гидравлическая схема ЖХ (хроматографический тракт) в простейшем случае состоит из резервуара для элюента, насоса, дозатора, колонки, детектора и приемника элюата, соединенными между собой капиллярными трубками. Основное назначение насосов состоит в создании стабильного установленного потока элюента в определенном диапазоне расходов и обеспечении давления, необходимого для пропускания элюента при этом расходе через колонку.

Современные насосы для жидкостной хроматографии представляют собой прецизионные устройства, обеспечивающие постоянную подачу растворителя в колонку и способные создавать давления до нескольких десятков мегапаскалей. Производительность насосов лежит в диапазоне от 1 мкл/мин (микроколоночная и капиллярная ЖХ) до 25–100 мл/мин (препаративная ЖХ).

Насосы для ВЭЖХ должны удовлетворять целому ряду требований. Материалы, из которых они изготовлены, должны обладать химической инертностью по отношению к подвижной фазе.

Они должны создавать достаточно высокое рабочее давление, необходимость которого определяется сопротивлением используемых колонок и скоростью потока и может колебаться в весьма широких пределах. Можно считать, что давление 15–20 МПа достаточно для решения большинства аналитических задач в ВЭЖХ. В настоящее время разработаны насосы для ВЭЖХ высокого давления с рабочим давлением до 320 МПа. Важна высокая стабильность скорости потока. Точность поддержания скорости потока в колонке во многом определяет результаты как качественного, так и количественного анализа. Для основных вариантов ВЭЖХ нестабильность потока не должна превышать 0,5 – 1%. В эксклюзивной хроматографии при анализе молекулярно-массового распределения полимеров требования еще выше – 0,1–0,3%.

Для уменьшения уровня флуктуационных шумов детекторов насосы должны обеспечивать стабильный расход без пульсаций, диапазон расходов должен быть пригоден для любого метода ЖХ и составлять 0,01—100 мл/мин. С помощью насосов могут быть созданы два принципиально различных режима работы: *изократический*, характеризующийся постоянством состава подвижной фазы во время анализа, и *градиентный*, в котором состав элюента меняется во время анализа по заданной программе. Имеются два принципиально различных типа насосов: постоянного давления и постоянного расхода. Насосы первого типа поддерживают установленное постоянное давление на входе в колонку, а расход определяется ее сопротивлением. Насосы второго типа поддерживают постоянный расход элюента, а давление на входе в колонку определяется ее сопротивлением. Основными характеристиками насосов являются максимальное рабочее давление, диапазон расходов, стабильность поддержания расхода или давления, инертность по отношению к элюенту и пробе, простота сборки и разборки.

Для работы на современных аналитических колонках длиной 50–250 мм и внутренним диаметром 2–10 мм, заполненных сорбентом с диаметром частиц 5–15 мкм, при применении растворителей средней вязкости и при комнатной температуре требуется давление элюента от 0,5 до 30 МПа. При использовании сорбентов с диаметром частиц 3 мкм и менее и колонок длиной более 300 мм может потре-

боваться созданию более высоких давлений (до 50—70 МПа). Применение высоких давлений в жидкостной хроматографии обуславливает повышенные требования к конструкциям и характеристикам насосов, клапанов, сальников, двигателей, дозаторов, колонок и соединительных линий.

В зависимости от величины рабочего давления насосы можно разбить на три класса: насосы низкого давления (0.2-0.5 МПа), среднего (0.5-5 МПа) и высокого давления (5-70 МПа). Рабочее давление определяет конструктивные особенности насоса.

Стабильность поддержания расхода с погрешностью менее 1% во всем диапазоне расходов позволяет использовать большинство из наиболее распространенных и выпускающихся серийно детекторов. Стабильность потока элюента непосредственно влияет на погрешность и воспроизводимость результатов анализа, а также на уровень флуктуационных шумов нулевого сигнала некоторых типов детекторов.

С целью сглаживания пульсаций в современных насосах применяют демпфирующие устройства, многоголовочные системы поршневых насосов, приводящиеся в действие с помощью специально рассчитанного на ЭВМ кулачка, микропроцессорный контроль пульсаций. Так как насосы в жидкостной хроматографии должны работать с любыми элюентами, при $pH=3-10$, в том числе с кислотами, растворами солей, агрессивными органическими жидкостями, высокие требования, как правило, предъявляются к конструкционным материалам насосов. Наилучшим материалом для жидкостного тракта насоса является титан и его сплавы с палладием или цирконием. Тем не менее самыми распространенными и доступными материалами являются нержавеющая сталь марки SS 316 (допускается использование отечественной нержавеющей стали X18H9T) и полимерный материал РЕЕК (полиэфирэфиркетон), из которых изготавливаются гидравлические тракты подавляющего большинства ВЭЖХ систем в мире.

Для плунжеров и шариковых клапанов наилучшими материалами являются лейкосапфир и рубин. Сальники обычно изготавливают из тефлона или полиамида. Детали насосной системы, контактирующие с элюентом, должны соединяться переходниками (фи-

тингами) из тех же материалов, из которых изготовлен насос. В связи с непрерывной работой в тяжелых условиях некоторые детали насоса быстро изнашиваются, коррозируют, загрязняются. При этом необходима разборка насоса и замена или чистка этих деталей. Поэтому легкость разборки насоса является одной из определяющих его характеристик.

К насосам постоянного давления относят насосы, в которых применяют сжатый газ и насосы с пневмогидравлическим усилителем. Насосы такого типа обычно используют при давлениях не выше 5 МПа, так как стандартное давление в газовых баллонах не более 15 МПа. Газовые насосы не имеют движущихся частей, работают надежно и достаточно легко перезаполняются газом. Их недостатками являются относительно невысокое давление и сложность замены растворителей, связанная с промывкой коммуникаций. В пневмогидравлическом насосе давление жидкости, создаваемое плунжером, пропорционально давлению газа на поршень и зависит от отношения сечений поршня и плунжера. Предел отклонения расхода элюента от среднего значения составляет $\pm 5\%$. Расход элюента зависит от заданного входного давления воздуха и сопротивления колонки, которое в свою очередь зависит от размера частиц сорбента, степени их уплотнения и вязкости элюента. Объем элюента в рабочей камере насоса в среднем составляет от 20 до 60 см³. Регулировка потока достаточно проста. Поток можно мгновенно остановить. При повторном пуске давление быстро восстанавливается. Справедливости ради стоит отметить, что в современной ВЭЖХ практике данный тип насосов практически не используется.

К насосам постоянного расхода относят шприцевые, поршневые и мембранные насосы. В шприцевом насосе поршень движется с помощью червячной передачи от шагового двигателя в калиброванной трубке, сжимая элюент и пропуская его через трехходовой кран в колонку. При заполнении шприца кран поворачивают, элюент засасывается в шприц, при этом вращение шагового двигателя меняется на противоположное. Полный объем шприца варьирует от 2.5 до 400 см³. Максимальное давление шприцевого насоса Милихрома не более 5 МПа, точность подачи элюента около 1%. Насос применяют для обеспечения работы колонок внутренним диаметром 2 мм и дли-

ной менее 100 мм. Шаговый двигатель позволяет получать различные скорости перемещения штока. Расход элюента можно менять от 2 до 600 мкл/мин. Один шприцевой насос может быть использован для создания ступенчатого градиента путем применения специальной программы его заполнения. Два шприцевых насоса легко приспособить для получения градиента путем программируемого увеличения расхода элюента первым насосом и пропорционального уменьшения расхода другого элюента вторым насосом.

Шприцевый насос хроматографа Laboratomі prіstoe (Чехия) обеспечивает расход 0.5-10 мл/мин при рабочем давлении до 25 МПа.

Существенным недостатком насоса является невозможность коррекции на сжимаемость растворителей. Для давлений менее 5 МПа этот недостаток не столь существен. Однако при давлении в колонке более 20 МПа сжимаемость элюентов составляет более 1%. При этом наблюдается значительная задержка в достижении установленного значения расхода потока элюента при включении насоса. Такая задержка особенно нежелательна при вводе пробы методом остановки потока.

Следующим типом является возвратно-поступательный насос с одним плунжером. Принцип его работы основан на вытеснении определенного объема жидкости из камеры с помощью плунжера. Плунжер приводится в действие с помощью эксцентрика, подсоединенного к двигателю насоса. Насос на входе и выходе имеет обратные шариковые клапаны. Шарик и седла для них обычно изготавливают из нержавеющей стали, сапфира или рубина. Для надежной работы таких клапанов необходимо полное отсутствие в элюенте твердых взвешенных частиц. Твердые частицы устраняют с помощью пористых фильтров из нержавеющей стали или титана с размером пор от 1 до 5 мкм. Наиболее слабыми местами поршневых насосов являются уплотнения плунжера и клапаны. Производительность насосов возвратно-поступательного типа зависит от длины рабочего хода плунжера. В связи с тем, что одна половина хода поршня используется для нагнетания, а другая для заполнения камеры насоса, одноплунжерный насос имеет значительную пульсацию на выходе, поэтому для таких насосов чаще всего применяют демпферы для сглаживания пульсаций. Систему узлов, со-

стоящую из насоса, демпфера, аварийного клапана максимального давления, измерителя давления, резервуаров для растворителей и фильтров, обычно называют системой подачи элюента. В новых конструкциях одноплунжерных насосов время заполнения камеры насоса (около 20 мс) значительно меньше времени рабочего хода плунжера. Поэтому за время возврата плунжера в исходное положение падение давления незначительное. Микропроцессорный контроль над работой шагового двигателя и плунжера позволяет компенсировать колебания потока во время заполнения и эффект сжимаемости растворителей.

Для сглаживания пульсаций потока применяют двухплунжерные насосы со сдвигом работы плунжеров по фазе на 180° и трехплунжерные насосы со сдвигом на 120°. Нагнетание жидкости плунжерами не только сдвинуто по фазе, но и синхронизировано. Конструкции насосов возвратно-поступательных типов просты, обычно обеспечивают свободный доступ к местам возможных течей, насосы легко разбираются и собираются с целью очистки и ремонта. Увеличение или уменьшение размеров камер и плунжеров путем их достаточно простой замены без изменения системы привода увеличивает или уменьшает производительность насосной системы и позволяет работать с полупрепаративными и микронасадочными колонками. В большинстве насосов возвратно-поступательного типа применяют шаговые двигатели, скорость которых легко контролируется с помощью электронной схемы управления. Появляется возможность достаточно простого программирования расхода потока элюента, т. е. применения системы градиентного элюирования. Эффект создания градиента в наиболее простом случае достигается путем контролируемого смешения двух растворителей разной полярности.

При градиентном режиме ЖХ используют две различные системы создания градиента: смешение на стороне высокого давления и смешение на стороне низкого давления. Для смешения на стороне высокого давления характерно применение отдельных насосов для каждого растворителя и их смешение в камере на выходе насосов. Смесительная камера должна обеспечивать полное перемешивание растворителей. Насосы управляются по определенной программе, заложенной в устройство программирования или микропроцессор.

При смешении на стороне низкого давления растворители из отдельных резервуаров засасываются насосом через регулируемые электромагнитные клапаны в смесительную камеру, из которой смесь растворителей поступает в дозатор и колонку жидкостного хроматографа. Работу клапанов обычно контролируют микропроцессором.

Схемы насосов и принципы их работы изложены в [13,51,57].

Большинство современных насосов снабжено указателями и ограничителями нижнего и верхнего пределов рабочего давления. Давление в хроматографической системе является исключительно важным параметром, и его необходимо контролировать. Для этой цели обычно используют указатель давления с проточными тензодатчиками. Объем датчиков очень мал, поэтому не возникает затруднений при замене растворителя в градиентном элюировании. Ограничители давления автоматически отключают насос при выходе давления из установленного диапазона, что существенно повышает безопасность работы. Ограничитель верхнего предела также очень полезен для предотвращения порчи колонок с некоторыми сорбентами, которые могут разрушиться при превышении допустимого для них рабочего давления.

3.3. Системы ввода пробы

3.3.1. Системы ручного ввода пробы

Системы ввода пробы для ЖХ можно разделить на ручные и автоматические (автосамплеры). Простейшим является инжектор с остановкой потока ("стоп флоу"). Он включает в себя кран для перекрытия потока перед инжектором и тройник, к которому подсоединены колонка, подводящий растворитель, капилляр и заглушка. Когда нужно ввести пробу, останавливают насос, перекрывают кран, отворачивают заглушку, набирают пробу в микрошприц, вводят иглу до упора в фильтр колонки, наносят пробу, вынимают микрошприц, заворачивают заглушку, открывают кран и включают насос. Поток растворителя вымывает пробу в колонку. Современные инжекторы позволяют вводить пробу в колонку без остановки потока. Инжектор прост по конструкции, однако требует много ручных операций при

работе, нарушается стационарность потока растворителя, что приводит к появлению ложного пика и затрудняет точные количественные измерения удерживания, эффективности и других параметров. Среди ручных инжекторов наиболее распространен кран-дозатор, в состав которого входят сменные петли из химически стойкого материала (легированной стали) с определенными объемами. Для аналитической жидкостной хроматографии объем петли варьирует в пределах 5-100 мкл, в препаративной ЖХ ее объем доходит до нескольких мл. Лидером по производству инжекторов является фирма "Rheodyne" (США), а подавляющее большинство хроматографических систем в мире комплектуется инжекторами модели 7725, представляющими собой шестиходовые краны – дозаторы. Схема переключения потоков в данной модели инжектора приведена на рисунке 3.2.

Пробу вводят в петлю заданной вместимости при давлении, близком к атмосферному, с помощью микрошприца или шприца. Затем поворотом крана петля сообщается с линией подачи растворителя от насоса и входом колонки, проба вымывается из петли и попадает в колонку. Проба может вводиться либо с полным заполнением петли, либо с ее частичным заполнением. Первый способ является предпочтительным при количественном анализе и позволяет получить наиболее воспроизводимые результаты анализа. Он требует для полного заполнения петли подачи в нее объема пробы, в 5-6 раз превышающего вместимость петли. Это необходимо для полного вытеснения из петли растворителя пробой. Частичное заполнение петли удобнее, так как позволяет, не меняя петли, вводить произвольный объем пробы. Точность количественного анализа в этом случае будет ниже, чем при

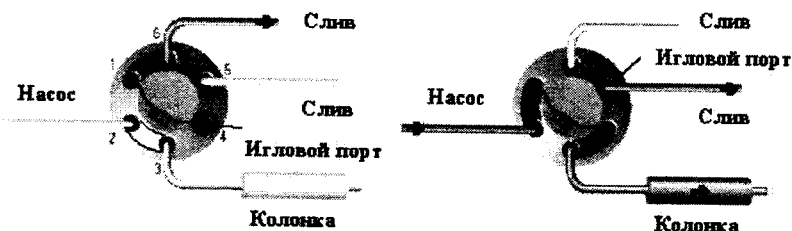


Рис. 3.2. Схема переключения потоков в инжекторе модели 7725 ("Rheodyne", США)



Рис. 3.3. Профиль потока пробы в петле инжектора

полном заполнении петли. Гидродинамика заполнения петли такова, что из-за трения у стенок петли остается исходный растворитель, а передний фронт приобретает форму конуса (см. рис. 3.3). Если при частичном заполнении петли подать объем, равный вместимости петли или близкий к нему, часть конуса выйдет за пределы петли в слив и не попадет в колонку. Точно так же при полном заполнении петли, не вытеснив весь растворитель от стенок, невозможно получить воспроизводимых результатов анализа. В канале останется часть пробы, которая не попадает в колонку при частичном заполнении петли.

Петлевые инжекторы обычно могут работать при давлениях до 50-70 МПа, однако срок их службы значительно удлинится, если прижим трущихся деталей уменьшается так, чтобы герметичность сохранялась до 35 МПа. Петлевые инжекторы делятся на имеющие внешнюю и внутреннюю петли. Внешние петли представляют собой обычно сменные капилляры определенной вместимости. Внутренние петли представляют собой каналы установленной вместимости, выполненные в корпусе инжектора. Как правило, вместимость внутренних петель мала (0.06-10 мкл), и инжекторы такого типа предназначаются для микроколоночной ВЭЖХ. Есть инжекторы, которые могут перестраиваться от варианта работы с внутренней петлей к работе с внешней петлей. Некоторые инжекторы снабжаются устройствами для фильтрации вводимых образцов. Существуют пневматические или электрические приводы к инжекторам, позволяющие ввести пробу по команде от микропроцессора.

3.3.2. Автоматизированные системы ввода пробы

Ручные инжекторы в ЖХ 5-го поколения вытесняются автоматическими инжекторами – автосамплерами, которые в соответствии с заданной программой могут вводить от 20 до 100 и более образцов. Они обеспечивают выполнение всех циклов ввода пробы: промывку петли, заполнение, ввод пробы автоматически. При этом последовательность анализа образцов и число вводов одной и той же пробы могут быть заданы. Автосамплеры повышают стоимость системы, поэтому их применение оправдано только в тех случаях, когда необходимо анализировать большое количество идентичных проб в массовых рутинных анализах. Наконец, следует упомянуть об инжекторах-насосах, способных по команде подать на колонку пробу определенного объема и остановиться. Их применение полностью оправдано, когда нужно многократно подавать на препаративную колонку воспроизводимо и без размывания один и тот же образец. Такими насосами, управляемыми микропроцессором коллектора фракций, целесообразно комплектовать автоматическую препаративную изократическую систему.

Автоматические дозаторы обычно бывают трех типов: петлевого с пневматическим или электромеханическим приводом, шприцевые с дозированием с помощью калиброванного микрошприца с остановкой или без остановки потока и дозированием с помощью насоса с остановкой или без остановки потока. При этом основным дозирующим элементом подавляющего большинства автосамплеров является шестиходовой инжектор, устройство которого описано в предыдущем разделе. В современной ЖХ практически все автоматизированные системы ввода пробы управляются микропроцессорной техникой, связанной через интерфейс с компьютером, оснащенный соответствующим пакетом программ.

Среди всего многообразия конструкций автоматических дозаторов можно четко выделить три основных типа, доминирующих на современном хроматографическом рынке: автосамплеры с заполнением петли методом вакуумирования, автосамплеры с заполнением петли методом нагнетания (рис. 3.4) и автосамплеры со встроенным петлевым дозатором.

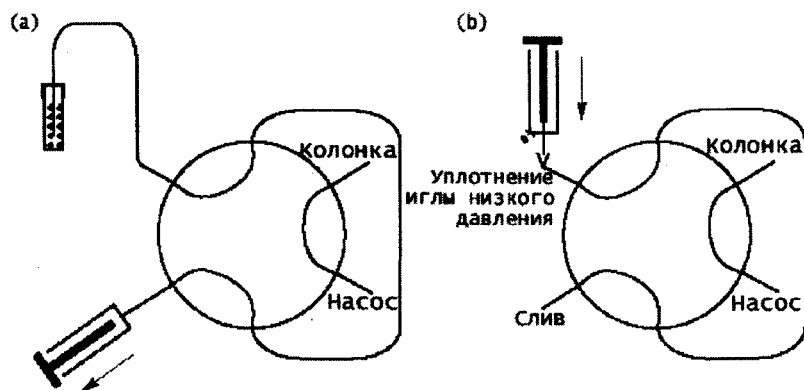


Рис. 3.4. Схематичное устройство автосамплеров с заполнением петли методом вакуумирования (а) и автосамплеров с заполнением петли методом нагнетания (б)

Принцип действия устройств первого типа основан на отрицательном давлении, создаваемом, как правило, при помощи шприца, в результате чего проба заполняет петлевой дозатор инжектора. Эти устройства давно завоевали популярность благодаря своей простоте и надёжности. Классическим примером устройства дан-

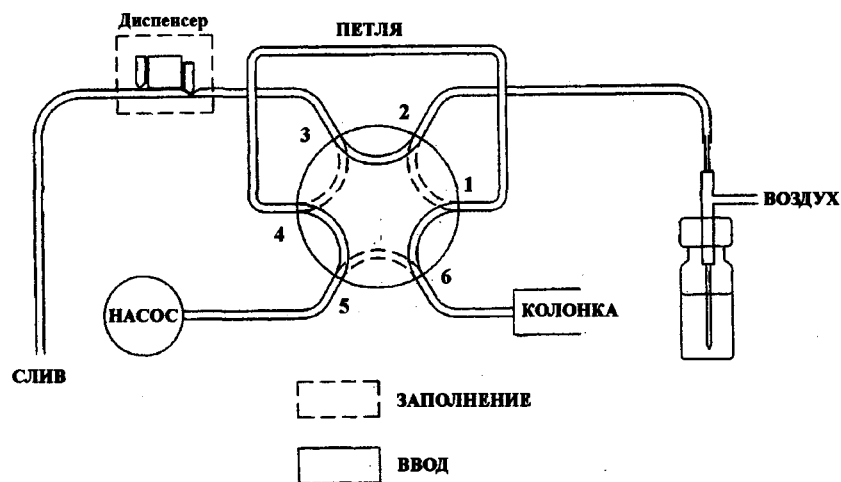


Рис. 3.5. Ввод пробы в автосамплере “Бэйсик-Стайер” (ЗАО “НПКФ Аквилон”, Россия)

ного типа является автосамплер “Бэйсик-Стайер” (ЗАО “НПКФ Аквилон”, Россия), принцип действия которого и схема совмещения портов крана – дозатора в положениях “ЗАПОЛНЕНИЕ” и “ВВОД” приведён на рисунке 3.5.

Роль шприца в данной модификации автосамплера выполняет миниатюрный диспенсер (перистальтический насос). Диспенсер продувает около 10 мкл воздуха через иглу для забора пробы в целях максимально эффективного удаления остатков предыдущей пробы. При нахождении крана – дозатора в положении “ВВОД” коаксиальная пара игл вводится в пузырёк с пробой. Для того чтобы исключить возможность образования пузырьков воздуха в процессе забора пробы, через внешнюю воздушную иглу создаётся избыточное давление. Диспенсер забирает “промывочный объём” (программируемый, 30 – 999 мкл) из пузырька с пробой для того, чтобы заполнить заборную линию и удалить из неё остатки предыдущей пробы. Кран – дозатор переключается в положение “ЗАПОЛНЕНИЕ”. Диспенсер прокачивает от 2 до 3 петлевых объёмов через петлю для её количественного заполнения. Кран – дозатор переключается в положение “ВВОД”. Проба смывается подвижной фазой в хроматографическую колонку. При этом активируется сбор данных. Автосамплеры данного типа отличаются простотой конструкции и, как правило, снабжаются иглой, движущейся по одной оси (вверх и вниз). Недостатком же такой конструкции является повышенный расход пробы (для того чтобы заполнить петлю необходимо сначала заполнить пробой иглу и соединительный капилляр).

Большинство современных автосамплеров используют технику положительного заполнения петли пробой. Данная техника схожа с техникой ручного ввода пробы. Шприц подходит к пузырьку с пробой, забирает заданный объём и вводит его в порт крана – дозатора, заполняя петлю. Заполнение шприца и ввод пробы контролируются шаговым двигателем, благодаря чему обеспечивается очень точное дозирование пробы. Помимо этого снижается избыточный расход пробы по сравнению с устройствами первого типа.

В последние годы стали появляться автосамплеры со встроенной петлёй, позволяющие автоматически вводить пробу без каких-либо дополнительных потерь. Это особенно важно при проведении

микроанализов, когда объём пробы строго ограничен. Основным недостатком подобной конструкции является наличие ненадёжного уплотнения высокого давления, при помощи которого игла для забора пробы крепится напрямую к инжектору. Этого недостатка лишены автосамплеры первого и второго типов. Другим недостатком является наличие фиксированной внутренней петли, максимальный объём которой может составлять 100 мкл. Автосамплеры первых двух типов могут комплектоваться петлёй любого объёма.

3.4. Системы термостатирования

Температура хроматографической колонки является очень важным контролируемым параметром в хроматографии. Большинство разделений в ВЭЖХ осуществляются при температуре окружающей среды. В ряде случаев этого вполне достаточно, но если к точности и воспроизводимости анализа предъявляются высокие требования, то колебания температуры в лаборатории (нередко составляющие 5 градусов и более) могут доставить аналитику немало проблем. Использование повышенных температур в изотермическом режиме анализа изменяет селективность разделения, способствует снижению вязкости растворителя (снижая тем самым рабочее давление в хроматографической системе), позволяет увеличить эффективность колонки. Стабилизация температуры также повышает точность количественных определений, поэтому использование термостатов желательно, а иногда обязательно. Влияние температуры на времена удерживания можно грубо охарактеризовать следующим правилом: время удерживания отдельно взятого компонента пробы будет уменьшаться на 1 – 3 % с увеличением температуры колонки на 1 градус. К сожалению, влияние температуры на селективность разделения не удастся описать простым правилом: разделение одной пары пиков может улучшаться при повышении рабочей температуры колонки, тогда как селективность разделения соседних пиков может ухудшаться. Тем не менее контроль температуры разделительной колонки является мощным инструментом в руках аналитика при разделении сложных многокомпонентных смесей. Соответствует действительности также и другое

положение: если температура аналитической колонки не контролируется, то есть опасность испортить даже самым тщательным образом разработанный метод разделения.

В ВЭЖХ чаще всего применяют воздушные термостаты с интенсивной циркуляцией воздуха, в которых расположены теплообменник для подогрева растворителя, дозатор и колонки. Для обеспечения безопасности работы термостат продувают азотом и часто устанавливают в нем датчики, реагирующие на появление паров органических растворителей и включающие световую или звуковую сигнализацию, предусмотрена защита от перегрева. Используют также термостаты без циркуляции воздуха, жидкостное термостатирование колонки с циркуляцией теплоносителя от термостатируемого источника, пассивное термостатирование металлического блока или специального термостата (рубашки), в котором расположены хроматографические колонки (термостаты последних двух типов также называют твердотельными). Размер рубашек должен строго соответствовать размеру и числу колонок и предколонок. На рисунке 3.6 изображён твердотельный термостат колонок TS 10 (ЗАО “НПКФ Аквилон”, Россия), состоящий из двух функциональных модулей – термостатируемого блока и контроллера, предназначенного для управления термостатируемым блоком. Управление может осуществляться как с собственной клавиатуры контроллера, так и с персонального компьютера.

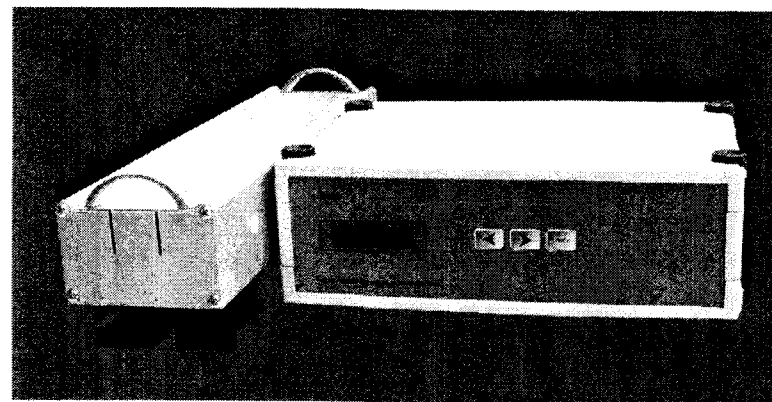


Рис. 3.6. Термостат колонок TS 10 (ЗАО “НПКФ Аквилон”, Россия)

Широко применяются в настоящее время термостаты колонок на основе элементов Пельтье. Принцип действия термостатов данного типа основывается на так называемом эффекте Пельтье: при прохождении электрического тока через термопару (две пластины, выполненные из различных проводниковых материалов и соединённые в двух точках), одна точка термопары разогревается, а температура другой падает. Большим преимуществом термостатов с использованием технологии Пельтье является возможность работать в режимах нагрева и охлаждения (охлаждение колонки улучшает разделение изомеров и энантиомеров и повышает чувствительность флуоресцентного детектирования), а также в режиме градиента температуры.

Для проведения большинства работ в ВЭЖХ вполне достаточным является диапазон термостатирования до 100°C с точностью поддержания температуры $\pm 0.1 - 0.5^\circ\text{C}$. В отдельных случаях, в частности, в эксклюзионной хроматографии некоторых синтетических полимеров, необходимо термостатирование до 150 °C. Обычный диапазон температур в ЖХ составляет от 35-90° C. В современных приборах температурный контроль полностью автоматизирован и осуществляется с помощью микропроцессора.

3.5. Детекторы

Детектор – составная часть хроматографа, которая служит для преобразования физических или физико-химических параметров элемента детектора (ячейки), чувствительного к изменению концентрации определяемых веществ, в электрический сигнал, передаваемый на регистратор хроматограммы (пишущий потенциометр) или компьютерную систему, связанную через интерфейс с хроматографом. Детектор реагирует на различие в составе подвижной фазы, не содержащей компонентов разделяемой смеси, и подвижной фазы с разделенными сорбатами, выходящими из колонки. Детекторы подразделяют на селективные и универсальные. Селективные детекторы избирательно реагируют на конкретный класс соединений, либо фиксируют изменение каких-либо физико-химических свойств выходящего из колонки растворителя, обусловленное наличием в нем

анализируемых компонентов. Универсальный детектор реагирует на все соединения. Например, конструктивно простым детектором универсального типа является *микроадсорбционный детектор* [54,130], измеряющий теплоту сорбции, выделяющуюся при прохождении зоны вещества через неподвижную фазу. В качестве примера селективного детектора можно назвать флуориметрический детектор, а в качестве универсального – рефрактометрический.

В ходе развития ЖХ апробировано около 30 типов детекторов для ЖХ [51,54,57,130,286-304]. Основную массу предложенных детекторов можно разделить на оптические, электрические, электрохимические и детекторы для измерения радиоактивных веществ. В некоторых детекторах используют сразу несколько принципов детектирования, причем такие детекторы можно разделить на две группы: в первой – механическое совмещение нескольких разных или одинаковых типов детекторов в единой конструкции, во второй – регистрация различных физико-химических явлений в одной ячейке детектора. К первой группе детекторов можно отнести электрохимические детекторы с двумя рабочими электродами, один из которых окислительный, а другой восстановительный. Типичными представителями второй группы являются флуориметрический – фотоакустический – фотоионизационный детектор или ультрафиолетовый – электрохимический детектор. В настоящее время для жидкостной хроматографии более 60 фирм серийно производят ультрафиолетовый абсорбционный детектор на фиксированную длину волны (254 нм), более 70 фирм – спектрофотометрические с переменной длиной волны (190-900 нм), 45 фирм – флуориметрические детекторы, более 50 фирм – рефрактометрические, 45 фирм – электрохимические, более 40 фирм – кондуктометрические, 22 фирмы – амперометрические, 18 – хемилюминесцентные, 17 фирм – масс-спектрометрические и светорассеивающие, 13 фирм – хиральные и массовые (по испарению), 10 фирм – инфракрасные, ультразвуковые и радиоактивные, 10 фирм пламенно-ионизационные детекторы. Большинство фирм, выпускающих жидкостные хроматографы, включают в состав поставляемых приборов не более 3-4 детекторов. Специфические детекторы поставляются по отдельным заказам. Принципиальные схемы основных типов детекторов приведены в [51,54,57,130,286-304].

3.5.1. Оптические детекторы

Оптические детекторы можно разделить на следующие классы [34]: абсорбционные, работающие в УФ области спектра (190–380 нм); абсорбционные для видимой области спектра (380–800 нм); инфракрасные детекторы (800–5000 нм); рефрактометрические различных типов; эмиссионные, флуориметрические и хемотроминесцентные. Наиболее часто в ЖХ применяют фотометрические детекторы, работа которых основана на измерении поглощения (абсорбции) света в ультрафиолетовой или видимой областях спектра. Это связано с тем, что большинство химических соединений имеют достаточно интенсивные полосы поглощения в диапазоне длин волн 200–800 нм. Наличие подходящих растворителей, прозрачных в этом диапазоне длин волн, делает фотометрические методы особенно пригодными для градиентного элюирования. Фотометрические детекторы имеют достаточно высокую чувствительность для поглощающих свет веществ, широкий линейный динамический диапазон (до 10^5), малый рабочий объем ячеек (<1 мкл), небольшое экстраколоночное расширение пиков и высокую воспроизводимость показаний. Они являются неdestructивными, относительно нечувствительными к колебаниям потока подвижной фазы и изменениям температуры. Чувствительность фотометрических *ультрафиолетовых детекторов* может достигать до 0,001 единиц оптической плотности на всю шкалу при 1% шума. При такой высокой чувствительности могут быть зафиксированы малые количества (до нескольких нг) слабо абсорбирующих УФ веществ. Широкая линейная область позволяет анализировать как примеси, так и основные компоненты на одной хроматограмме. Фотометрические детекторы, в свою очередь, подразделяют на детекторы с фиксированной длиной волны, детекторы со сменной с помощью фильтров длиной волны и спектрофотометрические детекторы с плавно изменяемой длиной волны в определенной области длин волн (*спектрофотометрические детекторы*). Наиболее простые и дешевые УФ детекторы широко применяют в ВЭЖХ на приборах, предназначенных для массовых анализов. При применении ртутной, лампы низкого давления, обладающей высокой стабильностью и долгим временем жизни (более 5000 ч), детектирование проводят на

длине волны 254 нм, которой соответствует 90% энергии излучения. На этой длине волны высоким поглощением обладают многие органические соединения (ароматические, гетероциклические, кетоны и др.). В таком детекторе свет от источника излучения проходит через проточную ячейку, в которую из хроматографической колонки поступает поток элюента. Наиболее часто применяют ячейки с длиной оптического пути 10 мм, диаметром светового канала около 1 мм, с рабочим объемом около 8 мкл. Они оптимальны для аналитических колонок внутренним диаметром 4–6 мм, заполненных сорбентом с размером частиц около 5 мкм. Рабочий объем ячейки является одним из важнейших ее параметров. Например, ячейка объемом 8–10 мкл может привести к дополнительному размыванию пика на 30–50 мкл и может оказаться непригодной для пиков шириной менее 100 мкл. Уменьшение объема ячейки может быть достигнуто двумя путями: уменьшением длины оптического пути и уменьшением диаметра канала ячейки. Последнее приводит к падению интенсивности проходящего через нее света и к увеличению шума. Оба эти эффекта снижают чувствительность детектирования.

Оптические детекторы с целью компенсации фона чаще всего имеют две ячейки: рабочую и сравнительную. Для двухканального детектирования используют статический метод подключения сравнительной ячейки, в котором ее заполняют чистым растворителем, и динамический метод, когда поток элюента от насоса разделяют на 2 части и пропускают одну часть через рабочую, а другую часть через сравнительную колонку и сравнительную ячейку. В третьем варианте используют динамический метод с использованием дополнительного насоса низкого давления для пропускания через сравнительную ячейку того же растворителя. В динамическом режиме можно подсоединять сравнительную ячейку между сосудом с растворителем и насосом в зоне всасывания, а рабочую ячейку – после разделительной колонки. В последнее время получили распространение детекторы с одной ячейкой с компенсацией шума при помощи электронных средств.

Одной из основных проблем конструирования фотометрических детекторов является обеспечение возможности фотометрирования в достаточно широком диапазоне длин волн. Это необходи-

мо не только для получения максимальной чувствительности на длине волны, соответствующей ширине полосы максимального поглощения вещества, но и для значительного снижения чувствительности, облегчающего линейное детектирование при высоких концентрациях в случае препаративной хроматографии. Спектральный диапазон и степень его разделения на поддиапазоны зависит от спектральной характеристики источника излучения и от способа выделения необходимой спектральной полосы, осуществляемого до измерительной ячейки или после нее. Некоторые источники излучения имеют линейчатый спектр (например, ртутная лампа – 254; 303; 313; 365; 436; 546 нм и т. д.), другие – непрерывный спектр (например, дейтериевая лампа излучает в диапазоне 190–600 нм). Интенсивность их излучения в пределах рабочего диапазона приблизительно одинакова. Необходимую спектральную полосу выделяют двумя различными способами: с помощью дифракционных решеток, имеющих 1000–3000 штрихов на 1 мм, и применением интерференционных фильтров с заданной шириной спектральной полосы. В обоих случаях может быть получена спектральная полуширина от 1–2 нм до 10–20 нм.

Характерной особенностью многих фильтровых УФ детекторов является использование в них источников линейчатого спектра. Кроме ртутной, применяют кадмиевую и цинковую лампы с линиями на 229 и 214 нм соответственно. Применяют также преобразователи излучения с 254 на 280–290 нм и другие длины волн, отсутствующие в спектре ртути. Фильтровый УФ детектор, например, с четырьмя интерференционными фильтрами на 217 нм (полуширина полосы пропускания 20 нм), 254 нм (42 нм), 263 нм (15 нм), 279 нм (12 нм) перекрывает область 200–300 нм и реализует полные возможности 4-волновой записи хроматограмм, в том числе получение разностных хроматограмм и спектральных отношений. В этих случаях хроматографически неразделенные пики можно выделить количественно вычитанием стандартного сигнала из сигнала пробы.

В связи с вышеизложенным, применение УФ детекторов с дейтериевой лампой в качестве источника света и набором широкополосных фильтров позволяет выпускать недорогие 2-х – 4-волновые детекторы с выбором длин волн в диапазоне 200–300 нм.

Дополнительные возможности в детектировании дают спектрофотометрические детекторы, позволяющие работать в многоволновом режиме. Такие детекторы предназначены для фотометрирования элюата, выходящего из хроматографической колонки при различных длинах волн, например, в спектральном диапазоне 190–360 нм. Спектрофотометрический детектор состоит из источника света, монохроматора и фотометра. В качестве источника света применима дейтериевая лампа. Изменение длины волны осуществляется поворотом дифракционной решетки монохроматора с помощью шагового двигателя. Монохроматический световой пучок, управляемый вибратором, поочередно проходит через рабочую и сравнительную проточные ячейки. На мониторе ВЭЖХ прибора фиксируется хроматограмма при нескольких аналитических длинах волн, в остановленном потоке имеется возможность зарегистрировать спектр поглощения индивидуального сорбата. Одним из перспективных направлений развития фотометрических детекторов является применение фотодиодной матрицы. В таких детекторах непрерывное излучение источника проходит через проточную рабочую ячейку и попадает на дифракционную решетку. Луч отклоняется и фокусируется на плоскости, где расположена фотодиодная матрица, состоящая из 200–250 элементарных фотодиодов. Детектор выдает информацию сразу обо всем диапазоне длин волн 190–600 нм с дискретностью 2–5 нм в течение 10 мс. В связи с тем, что при регистрации спектра создается большой массив информации, обработка и запись спектров проводится с помощью быстродействующих компьютера и регистратора. Фотодиодные матричные детекторы позволяют получить за время одного анализа до 200–250 хроматограмм при разных длинах волн или трехмерную спектрохроматограмму, в которой по одной оси откладывается время удерживания, по другим – оптическая плотность и длина волны. Замечательная особенность детекторов на фотодиодной матрице заключается в том, что они позволяют проводить количественные оценки даже в случае, когда хроматографические пики не разделяются и перекрываются на всех длинах волн.

К фотометрическим детекторам относится также детектор, работа которого основана на поглощении света в инфракрасной об-

ласти спектра. Некоторые функциональные группы органических соединений имеют характеристические частоты в ИК области, поэтому *инфракрасные детекторы* пригодны для идентификации органических соединений. Одним из основных условий работы этих детекторов является прозрачность применяемых растворителей в ИК области спектра. Наиболее подходящими, но относительно редко применяемыми в хроматографической практике растворителями являются CCl_4 , CHCl_3 и CS_2 . Адсорбция ИК излучения может быть использована как для селективного, так и неселективного детектирования. Если ранее детекторы этого типа применяли главным образом в эксклюзионной хроматографии с колонками большого диаметра, то в настоящее время они все шире внедряются в ВЭЖХ. Свет от источника в детекторе проходит через обтюратор и диск с укрепленными на нем тремя интерференционными фильтрами на диапазоны 2.5-4.5, 4.5-8.0 и 8.0-14.5 мкм. Диск вращается, и любой из фильтров может быть легко установлен на пути луча света. Монохроматический ИК свет после фильтра проходит через щель и затем через ячейку детектора, которая обычно имеет длину оптического пути близкую к 1.0 мм. Прошедший ячейку свет попадает на термоэлектрический детектор, сигнал которого усиливается усилителем и передается на регистрирующее устройство.

Для всех соединений, имеющих одинаковые функциональные группы, показания ИК детектора примерно одинаковы. В связи с независимостью показаний от молекулярной массы анализируемых соединений этот детектор имеет значительные преимущества по сравнению, например, с рефрактометрическим детектором. Его молярные показания практически постоянны. Детектор достаточно стабильно работает при повышенных температурах ячейки (до 150 °С). В оптимальных условиях он может чувствовать около 1 мкг вещества с $M=300$, содержащего группу ОН и на длине волны 3,4 мкм. Более сильно поглощающие ИК излучение функциональные группы обеспечивают более высокую чувствительность, которая, однако, в среднем не превышает чувствительность рефрактометрического детектора. Имеются ЖХ системы, объединяющие жидкостный хроматограф с ИК-спектрометром, использующим преобразования Фурье [56,244]. Такая система позволяет одновременно записывать

несколько хроматограмм на ряде выбранных оператором полосах ИК спектра. Она позволяет анализировать органические вещества на уровне 1 мкг и служит для идентификации компонентов пробы, причем не полностью разделенные хроматографические пики могут быть разрешены с помощью программного обеспечения. Для фотометрических детекторов в настоящее время подбираются новые источники излучения, совершенствуются конструкции проточных ячеек, регистрация и обработка сигналов выполняются на компьютерах при помощи все более мощных программных продуктов.

3.5.2. Рефрактометрические детекторы

В отличие от фотометрических детекторов, реагирующих только на вещества, поглощающие свет в ультрафиолетовой, видимой и инфракрасной области спектра, *рефрактометрические детекторы* являются универсальными. Они особенно полезны, когда вещества не имеют интенсивного поглощения в УФ свете, не флуоресцируют и не обладают электрохимической активностью. Их принцип действия основан на дифференциальном измерении показателя преломления чистого растворителя и раствора анализируемого вещества в этом растворителе. Вклад растворенного вещества в изменение показателя преломления растворителя пропорционален объемной концентрации этого вещества, причем растворитель также является детектируемым веществом, так как имеет определенный показатель преломления. Данные детекторы обладают средней чувствительностью, их показания в сильной степени зависят от колебаний параметров, влияющих на состав подвижной фазы таких, как давление, температура и концентрация анализируемого вещества. Поэтому рефрактометрический детектор мало пригоден для градиентной хроматографии. Требуется кропотливый подбор системы растворителей, имеющих близкие показатели преломления. Только при этом становится возможным осуществить градиентное элюирование в определенных пределах концентрации смеси растворителей. Чувствительность детектора к изменениям температуры составляет для разных растворителей от $5 \cdot 10^{-4}$ до $5 \cdot 10^{-5}$ единиц показателя преломления на 1 °С. Что касается чувствительности к давлению, то она составляет $1 \cdot 10^{-4}$ - $5 \cdot 10^{-4}$

единиц показателя преломления на 1 МПа. Чувствительность детектора к температуре обуславливает специальные меры по стабилизации температуры самого детектора и подвижной фазы при входе в детектор. В этом случае применение более длинных соединительных трубок на входе в детектор, действующих как теплообменники, приводит к высокому экстраколоночному расширению пиков и снижает достигнутую в колонке эффективность разделения. В хроматографе, оснащённом рефрактометрическим детектором, с целью стабилизации потока элюента и параметров удерживания сорбатов в колонке желательнее применять термостатирование колонки и детектора. Для реализации максимальной чувствительности детектора на уровне 10^{-8} единиц показателя преломления точность термостатирования должна быть не более ± 0.01 °С. При хорошем термостатировании детектор мало чувствителен к изменениям расхода подвижной фазы. Он прост конструктивно, удобен в работе, неdestructивен и даёт высокую воспроизводимость показаний. Недостатком детектора является его нечувствительность к веществам, имеющим показатель преломления, одинаковый с растворителем.

Работа большинства современных рефрактометрических детекторов основана на трёх различных принципах измерения сигнала: отклонении, отражении и интерференции. На рисунке 3.6 представлена оптическая схема рефрактометра первого типа. Свет от лампы (1) проходит через конденсорную линзу (2), растровую решётку (3) и линзу (4), служащую для образования параллельных пучков света, которые попадают в кварцевую кювету. Кювета представляет собой две смежные призмы а, б, разделённые светопроницаемой перегородкой, образующие плоскопараллельную пластину. Призма а заполняется подвижной фазой, тогда как через призму б протекает элюат с хроматографической колонки (стрелки указывают на направление потока). При наличии разности показателей преломления в призмах свет, падающий на входную грань кюветы, преломляется на границе раздела призм и отклоняется на некоторый угол. Отклонённый свет расщепляется призмой и падает на пару фотодиодов (8). Разность сигналов обоих фотодиодов пропорциональна отклонению луча света, а, следовательно, и разности коэффициентов преломления. Установка нуля детектора осу-

ществляется вращением плоскопараллельной пластины (7), смещающей луч света.

Другой метод измерения основан на законе отражения света (закон Френеля), согласно которому интенсивность отраженного света, падающего на поверхность границы раздела жидкости и стекла, пропорциональна углу падения и разности показателей преломления двух сред. Преимуществом детекторов, работающих на этом принципе, является меньший объем ячеек (< 3 мкл), в связи с чем они могут работать при небольших расходах элюента и с высокоэффективными колонками. Однако чувствительность таких детекторов в 50–100 раз ниже чувствительности других типов рефрактометрических детекторов, что, кстати, делает их более пригодными для градиентного элюирования. Так как детектирование происходит на границе раздела жидкости и стекла, для получения стабильной работы детектора необходимо следить за чистотой стекла.

Детектор френелевского типа включает в себя источник света, конденсор, дифференциальную ячейку, стеклянные стержни, линзу и фотоприемник. В его состав входят также теплообменники и диафрагма для регулирования силы светового потока. Источник света, снабженный инфракрасным блокирующим фильтром, предназначен для создания светового потока в видимой части спектра. Конденсор предназначен для формирования плоского пучка света, падающего на ячейку. Ячейка рефрактометра изготовлена из нержавеющей стали, герметизируется защитными стеклами, призмой и тефлоновыми прокладками. Стеклянные стержни и линза фокуси-

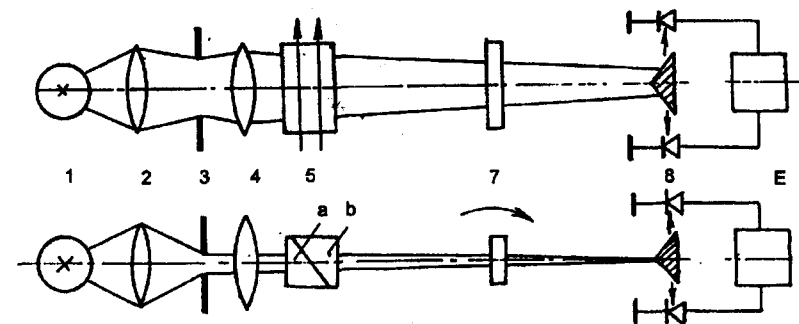


Рис. 3.7. Оптическая схема рефрактометрического детектора

руют прошедшие через ячейки световые потоки на светочувствительные элементы фотоприемника. Фокусировка позволяет устранить перекрывание световых потоков, которое может привести к дифференцированию хроматографических пиков.

Работа рефрактометрического детектора третьего типа основана на интерферометрическом принципе сдвига. Лучи света от источника видимой области спектра разделяются делителем на две части, фокусируются линзой и проходят через рабочую и сравнительную ячейки объемом 5 мкл. Лучи света затем объединяются с помощью другой линзы и делителя и попадают на чувствительный элемент. Различие показателей преломления рабочего и сравнительного потока элюента приводит к разнице в длине оптического пути, которая измеряется интерферометрическим детектором как изменение длин волн света. Показания этого типа детектора имеют достаточно широкий диапазон линейности, а чувствительность в 10 раз выше, чем для других рефрактометрических детекторов. При оптимальных рабочих условиях возможно детектирование около 3 мкг/мл растворенного вещества. Детектор фиксирует любой тип анализируемых веществ, независимо от структуры, молекулярной массы и других физико-химических свойств. Предел обнаружения для лучших рефрактометрических детекторов достигает 10^{-8} единиц показателя преломления. Однако уровень шума в этих детекторах на 2 порядка выше шума УФ детектора. Они оптимальны для применения, когда нет необходимости в высокой чувствительности, например, в препаративной ЖХ.

3.5.3. Флуориметрические детекторы

Принцип действия флуориметрического детектора основан на измерении флуоресцентного излучения поглощенного света. Поглощение обычно проводят в УФ-области спектра при длине волны максимального поглощения для данной группы веществ, а излучение измеряют на выходе фильтра, не пропускающего лучи возбуждения. Длины волн флуоресцентного излучения всегда превышают длины волн поглощенного света. В связи с тем, что детектирование ведется от нулевой интенсивности флуоресценции, данный тип детектора более чувствителен по сравнению с детекторами поглощения. В тех слу-

чаях, когда сорбат не флуоресцирует, можно до или после разделения компонентов на колонке получить соответствующие производные [12,235,305-308]. В флуориметрическом детекторе свет от источника излучения УФ света проходит через фильтр и фокусируется в проточной ячейке с прямоугольной или линейной конструкцией ввода возбуждающего света и вывода света эмиссии. Излучение проходит через фильтр и измеряется с помощью фотоприемника. Сборка оптического блока фильтрового флуориметра (без фотоприемника и источника света) приведена на рис. 3.7. При этом подвижная фаза (растворитель) не должна поглощать свет ни на длине волны поглощения, ни на длине волны излучения. Для сильно флуоресцирующих веществ предел детектирования достигает 10^{-12} г. На рис. 3.8. приведена типовая хроматограмма половины ПДК бензо(а)пирена в воде. При соответствующем выборе системы растворителей детектор пригоден для использования в градиентной хроматографии. С помощью флуориметрического детектора с высокой чувствительностью можно детектировать аминокислоты, амины, витамины и стероиды. Вы-

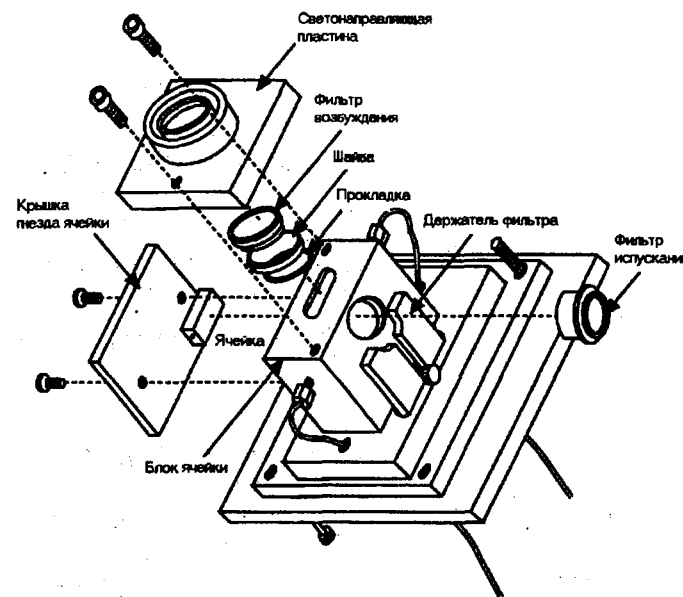


Рис. 3.8. Сборка оптического блока фильтрового флуориметра

сокая чувствительность является одним из главных его преимуществ. Этот детектор можно также применять для количественного определения микропримесей веществ и качественного определения ароматических углеводородов, биологически активных соединений, метаболитов и других флуоресцирующих соединений [12,13,51].

Значительное увеличение чувствительности флуориметрического детектора возможно при применении вместо ртутной лампы монохроматического лазера и гибких оптических световодов для введения света непосредственно в проточную ячейку малых размеров. При введении конца световода непосредственно в кварцевую капиллярную ячейку на выходе из хроматографической колонки и облучении ее несколько выше по ходу потока помощью Ag-ионного лазера под углом 90° получена чувствительность на уровне десятков пг для некоторых лекарственных препаратов. Предложен

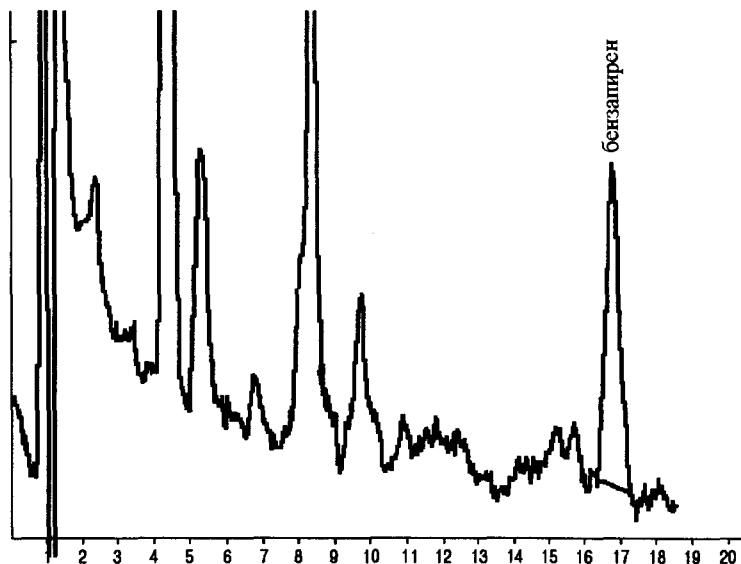


Рис. 3.9. Хроматограмма пробой питьевой воды, загрязненной бензо(а)пиреном в концентрации 0,0005 мкг/л (свидетельство об аттестации МВИ № 20-03, ЗАО "НПКФ Аквилон", Россия). Условия хроматографии: колонка – Луна C18(2) 150 x 2 мм, элюент – ацетонитрил-вода (74:26), расход – 0,3 мл/мин, детектирование – флуориметрическое (поглощение: 305-395 нм, испускание: 430-470 нм)

также лазерный флуориметрический детектор с двухфотонной наведенной флуоресценцией. Описан флуоресцентный метод детектирования, основанный на возбуждении молекул пробы β -частицами от ^{63}Ni -радиоактивного источника [51].

Применение флуориметрического детектора в ВЭЖХ дает возможность повысить селективность детектирования многих соединений. Получение флуоресцирующих производных с помощью химических реакций значительно расширяет эту возможность. Флуоресцентное детектирование с одновременным изменением pH подвижной фазы после колонки дает возможность увеличить флуоресценцию некоторых соединений и делает детектирование более специфичным. Селективность детектирования может быть также увеличена путем более тщательного выбора длины волны детектирования. Одновременное сканирование длины волн возбуждения и эмиссии позволяет установить чистоту вещества, регистрируемого одним пиком, провести его идентификацию. Следует отметить, что примеси, содержащиеся в подвижной фазе, и в первую очередь, растворенный кислород, способны вызывать гашение флуоресценции. Такое же действие оказывают кислородсодержащие растворители.

3.5.4. Электрохимические детекторы

В высокоэффективной жидкостной хроматографии наряду с широким применением оптических детекторов за последние 10–15 лет наметился значительный прогресс в развитии электрохимического метода детектирования [51, 204, 290, 291]. Доказательством этого является увеличение выпуска серийной аппаратуры.

Благодаря высокой чувствительности и селективности, электрохимические детекторы особенно эффективны для анализа некоторых важных для биохимии и медицины соединений таких, как эстрогены и катехоламины, присутствующие обычно в малых концентрациях в тканях, крови и других сложных объектах исследования. Эти детекторы применяют также для анализа веществ при исследовании загрязнений окружающей среды ввиду его высокой чувствительности и селективности к фенолам, бензидинам, нитросоединениям, ароматическим аминам и пестицидам [51].

Наибольшее применение электрохимические детекторы нашли в обращенно-фазовой и ионообменной ВЭЖХ, в которой используют полярные элюенты. В нормально-фазовой ВЭЖХ также можно применять ЭХД, если после разделительной колонки в неполярную подвижную фазу добавить электролит или подходящий растворитель с высокой диэлектрической проницаемостью.

Работа электрохимических детекторов основана на определении электрохимических свойств соединений в потоке элюента. Различают детекторы, которые реагируют либо на изменение свойств элюата, либо на конкретный компонент элюата. К первому типу относится кондуктометрический детектор, ко второму – амперометрические. Большинство электрохимических детекторов работают в амперометрическом режиме, при котором поддерживается постоянное напряжение между двумя электродами, погруженными в поток элюента, и регистрируется зависимость силы тока от времени.

Преимуществами электрохимических детекторов являются простота конструкций, высокая чувствительность и селективность. Имеется возможность регулирования селективности путем смены режимов работы детекторов, замены или модифицирования электродов. Для них возможно реализовать рабочий объем около 1 нл, меньший по сравнению с другими ВЭЖХ-детекторами. Электрохимический детектор с малым рабочим объемом может быть применен в микроколоночной и капиллярной хроматографии, что особенно актуально в связи с их быстрым развитием. Их достоинством является также малая зависимость показаний от температуры. Недостатками детекторов данного типа являются нестабильность, уменьшение чувствительности со временем в связи с изменением характеристик электродов, значительная зависимость сигнала от расхода и чистоты элюента и ограниченное применение в ВЭЖХ с градиентным элюированием.

Кондуктометрический детектор. Принцип работы его построен на том, что при создании разности потенциалов ионы, находящиеся в растворе, начинают перемещаться по направлению к противоположно заряженным электродам. Проводимость зависит от числа заряженных частиц в растворе – именно эта зависимость и положена в основу количественной оценки в кондуктометрии. Таким

образом, для получения количественных результатов должна быть постоянной молярная проводимость. При применении детекторов этого типа следует избегать протекания электрохимических реакций на поверхности электродов, поэтому используют источники переменного тока с частотой от 50 до 1000 Гц и напряжением от 5 до 10 В. Измерения проводятся с применением моста сопротивлений Уитстона. Детекторы данного типа наиболее пригодны для определения заряженных соединений в элюате, предпочтительны при анализе малых концентраций ионов [12,51].

Вольтамперометрический детектор. Вольтамперометрическое детектирование заключается в измерении электрического тока в ячейке, возникающего при окислении (восстановлении) регистрируемого вещества на поверхности рабочего электрода при подаче на него определенного напряжения [12,51]. Этот детектор обладает очень высокой чувствительностью, сравнимой с чувствительностью детекторов по флуоресценции. Кроме того, он высокоселективен, поскольку не все вещества легко окисляются или восстанавливаются. Вольтамперометрический детектор используется при анализе веществ, обладающих электрохимической активностью. Большинство неорганических ионов могут быть электрохимически окислены или восстановлены. Среди органических соединений электроактивными являются соединения с кратными связями, окисляемыми или восстанавливаемыми функциональными группами. При детектировании вещества необходима его способность при определенном потенциале окисляться или восстанавливаться в водном растворе в интервале от +1.2 до -0.8 В (электрод сравнения – хлорсеребрянный). Детектирование при потенциалах более +1 В или менее -1 В (относительно хлорсеребряного электрода) с использованием угольных или ртутных электродов приводит к уменьшению чувствительности и селективности. Вещества, содержащие фенольную, индольную или альдегидную группу, способны окисляться при низких потенциалах (0.4-0.7 В). В качестве рабочего электрода используются электроды из платины, золота, углеродной пасты, графита. Электрод, на котором протекает электрохимический процесс, называют рабочим электродом: катод (реакция восстановления) или анод (реакция окисления). Электрохимические детекторы работают только с проводящей водной ПФ, поэтому они

наиболее подходят для ОФХ или ионообменной хроматографии. Для увеличения проводимости ПФ в водный элюент добавляют нитрат калия, перхлорат натрия, а в органический – перхлорат тетраэтиламония. Между насосом и дозирующим устройством в линию подачи растворителя часто помещают скруббер – ячейку большей емкости. Потенциал ячейки устанавливают таким, чтобы все мешающие детектированию соединения либо окислялись, либо восстанавливались до момента ввода пробы. Для каждого класса соединений характерно свое напряжение разложения, следовательно, меняя напряжение, можно сделать детектор высокоселективным.

На практике легче осуществляется окисление, так как не надо удалять предварительно растворенный кислород. Измеряя зависимость силы тока от приложенного напряжения для электроактивного соединения в статических условиях, получают вольтамперограмму. Характерная особенность вольтамперограммы – наличие участка, на котором сила тока после резкого увеличения практически не меняется с изменением приложенного напряжения. Этот ток называется предельным. В величину предельного тока входит вклад электролита подвижной фазы (остаточный, или фоновый, ток). Следует отметить, что фоновые токи в электрохимических детекторах для ВЭЖХ могут в 1000 и более раз превосходить диффузионные (диффузионный ток представляет собой разность между предельным и фоновым токами).

В ячейке детектора создается такая разность потенциалов, при которой достигается предельный ток для определенного класса исследуемых веществ. Регистрируемые соединения в вольтамперометрических детекторах претерпевают минимальные электрохимические превращения. Степень превращения составляет от 1 до 3% (если степень превращения приближается к 100%, то детектор работает как кулонометрический).

Из-за адсорбции подвижной фазы и продуктов окислительно-восстановительной реакции на поверхности электродов возможна их пассивация, что, в свою очередь, ведет к снижению чувствительности и в конечном итоге может привести к определенным затруднениям в количественном анализе. В связи с этим рекомендовано применять внутренние стандарты. Пассивирование

электродов вызывает и постепенный дрейф нулевой линии, поэтому необходима тщательная очистка поверхности электрода от посторонних веществ.

В настоящее время разработаны многоканальные электрохимические детекторы, аналогичные УФ детектору с диодной матрицей. В электрохимическом детекторе потенциал электрода может быстро и периодически изменяться, при этом регистрируется зависимость электрохимического тока от напряжения – так называемая вольтамперометрия с быстрым сканированием, что аналогично записи оптического поглощения в зависимости от длины волны.

Кулонометрический детектор. Кулонометрический детектор назван так в связи с тем, что анализируемые вещества в нем электризуются полностью, в отличие от вольтамперометрического [51,290]. В этом детекторе применяют рабочие электроды с большой поверхностью. Для определения соединений с высокими окислительно-восстановительными потенциалами применен принцип двух последовательно расположенных рабочих электродов, один из которых (вышестоящий по ходу потока) является кулонометрической ячейкой для полного окисления примесных веществ с более низкими потенциалами, чем анализируемые соединения. Детектирование последних осуществляется вольтамперометрической ячейкой. Система вольтамперометрический – кулонометрический детектор позволяет провести селективное детектирование неразделенных пиков.

Полярографический детектор измеряет силу тока между поляризуемым и неполяризуемым электродами при заданной постоянной разнице потенциалов. В результате приложенного напряжения сорбат, попавший в ячейку детектора окисляется или восстанавливается. Детектор применим для определения нитроанилинов, нитрофенолов, нитрозаминов, стероидов, альдегидов, ионов металлов и неорганических ионов [51, 54,130].

Не получили пока широкого применения *емкостные детекторы (по диэлектрической проницаемости)* [54,130]. Детектор по диэлектрической проницаемости является универсальным, он более чувствителен, чем рефрактометрический, причем чувствительность не зависит от скорости потока, однако детектор данного типа чувствителен к флуктуациям температуры.

Масс-спектрометрический детектор. Исключительно информативным методом количественного детектирования и идентификации анализируемых соединений в жидкостной хроматографии является метод, в котором используют масс-спектрометр высокого разрешения и достаточного быстродействия в качестве детектора. Фирмой "Finnigan" (США) налажен серийный выпуск масс-спектрометрических детекторов, специально приспособленных для ЖХ [51,234,238,295,303]. Основной проблемой, затрудняющей применение этого детектора, была проблема ввода потока элюента в масс-спектрометр. Были использованы технология транспортной системы подачи пробы и прямой ввод элюента в масс-спектрометр. В обоих случаях требуется значительно большая, чем ранее было принято для газохроматографических систем, скорость откачки вакуумной части масс-спектрометра (500–600 л/мин). В детекторе с транспортным устройством элюент из колонки наносится на движущуюся ленту, на которой растворитель в зоне испарения элюента, затем испаряют пробу в вакуумной камере и через диафрагму подают в ионный источник. В зоне очистки лента очищается и снова подается к узлу нанесения элюента с помощью привода. Скорость нанесения элюента на движущуюся ленту или проволоку обычно не может быть больше 10 мкл/мин, так как для сохранения достигнутой в колонке эффективности и снижения уровня шумов скорость движения ленты должна быть достаточно высокой. Поэтому использование транспортной системы эффективно лишь при применении микроколонок или после предварительного отделения части потока элюента перед нанесением на ленту, в связи с тем, что оптимальный расход элюента в аналитической ЖХ составляет в среднем около 1 мл/мин, такое разделение потока уменьшает количество поступающей в детектор пробы в 100 раз. Экстраколоночное расширение пиков в рассматриваемой системе фирмы сравнимо с расширением для УФ детектора с объемом проточной ячейки 0.3 мкл. Развитие микроколоночной и капиллярной ВЭЖХ, а также капиллярного электрофореза, обуславливает разработку системы прямого ввода потока элюента в ионный источник масс-спектрометра. При этом, кроме высокопроизводительных систем откачки, как правило, требуется дополнительное

вымораживание элюента. Показано, что оптимальные расходы элюента и прямом вводе в спектрометр должны составлять 3–30 мкл/мин, что характерно для колонок с внутренним диаметром 0.5–1 мм, заполненных сорбентом с размером частиц 5–10 мкм. Так как экстраколоночное расширение в общем случае не должно превышать 50% от расширения пика в колонке, современные системы ВЭЖХ с масс-детектором, наряду с обеспечением уже достигнутого уровня чувствительности и линейности детектирования в ЖХ, должны иметь рабочий объем 0.1–1 мкл и экстраколоночное расширение менее 1 мкл. Для прямого ввода потока растворителя в масс-спектрометр применяют же специальную камеру, размещенную на выходе. Область дрейфа электрически заряженных капелек элюента сконструирована таким образом, чтобы сфокусировать их в ионном источнике детектора. В течение дрейфа большая часть растворителя испаряется и откачивается насосом. Если в качестве растворителя использовать ацетонитрил, то максимальный расход элюента в этом случае не может быть больше 20–50 мкл/мин [51]. Последние модели масс-детекторов для ЖХ успешно работают в диапазоне масс m/z от 20 до 4000 а.е.м. Так, типовой детектор LCQ фирмы "Finnigan" в случае химической ионизации при атмосферном давлении при расходе обращенно-фазового элюента 1 мл/мин (метанол – вода – АсОН 1:1:0.01) при вводе 5 мкл пробы резерпина с концентрацией анализируемого компонента до 10 пг/мкл достигает соотношения сигнал/шум 10:1 для протонированного иона m/z 609 с единичным разрешением в области 200–700 а.е.м. Аналогично высокая чувствительность (соотношение сигнал/шум 10:1) достигается в случае ионизации с применением электрораспыления (процесс испарения растворителя осуществляется в электрическом поле 1–6 кВ) при вводе 1 мкл пробы резерпина с концентрацией до 50 пг/мкл при расходе того же элюента до 200 мкл/мин для протонированного иона m/z 609 с единичным разрешением в области 200–700 а.е.м в режиме полного сканирования [234].

Масс-спектрометрический детектор предъявляет жесткие требования к чистоте растворителей (ацетонитрила, метанола и воды). Метод является дорогостоящим и сложным в обращении.

Детекторы радиоактивности. Разделение и количественное определение радиоактивных веществ находит достаточно широкое

применение для анализа меченых соединений с целью дозиметрического контроля при изучении химических реакций в органической и неорганической химии, биологии, микробиологии и медицине при биомедицинских исследованиях. Если разделяемые вещества имеют достаточно высокий уровень радиоактивности, определение в этом случае является специфичным и ему не мешает изменение состава элюента [51,54,130].

Применяют две принципиально отличные конструкции детекторов радиоактивности для ЖАХ. В одной использовано предварительное смешивание раствора сцинтиллятора с элюентом перед входом в детектор с последующим пропусканием смеси через сцинтилляционный счетчик. Этот метод детектирования обычно называют методом жидких сцинтилляторов. В другом типе детектора использованы проточные ячейки сцинтилляционных счетчиков, заполненные частицами твердых сцинтилляторов. Например, для обнаружения β -излучения в потоке элюента применяли твердые сцинтилляторы в виде стеклянных шариков, содержащих от 2.5 – 7.7% Li с общей массой около 0.5 г. Обычно проточные ячейки для радиоактивных детекторов изготавливают из стекла или тефлона.

При применении для радиоактивных детекторов необходимо обеспечение высокой скорости счета, которая прямо пропорциональна рабочему объему детектора и обратно пропорциональна расходу потока элюента. Детектор измеряет активность потока элюента в проточной ячейке и преобразует ее в напряжение выходного сигнала. Необходимо также учитывать фоновый сигнал, причем скорость фонового счета обычно составляет около 30 счетных единиц в 1 мин. При увеличении рабочего объема детектора и уменьшении расхода потока элюента чувствительность для радиоактивных детекторов при прочих равных условиях увеличивается. Однако эти изменения приводят к ухудшению достигнутого на колонке разрешения. С уменьшением рабочего объема детектора при постоянном расходе подвижной фазы и при сохранении эффективности разделения падает чувствительность детектора. Целесообразно, чтобы объем ячейки детектора составлял не более 0.1 объема первого пика хроматограммы анализируемой смеси. При применении твердых сцинтилляторов эффективность счета составляет

6% для ^3H , 10% для ^{32}P , 70% для ^{14}C и 7% для ^{123}I . В этом случае эффективность счета зависит от размера частиц сцинтиллятора.

Преимуществами радиоактивного детектора являются хорошая воспроизводимость показаний, большой линейный диапазон детектирования, нечувствительность к колебаниям расхода элюента, возможность его применения в градиентном элюировании, низкий предел детектирования (около 100 счетных единиц в 1 мин для ^{14}C), применимость в препаративной хроматографии и для большого числа α -, β -, γ -радиоактивных элементов.

Детекторы светового рассеяния. Начиная с 1992 г. выпускаются перспективные детекторы по измерению светового рассеяния. Принцип их работы основан на различии давлений паров хроматографических растворителей, входящих в состав элюента, и анализируемых веществ [51, 282, 300]. Элюент с пробой на выходе из колонки вводится в распылитель, смешивается с азотом или CO_2 и в виде мелкодисперсного аэрозоля попадает в обогреваемую испарительную трубку (30 – 160 °C), в которой подвижная фаза испаряется, образуя тонкий туман высушенных частиц пробы (суспензия), поток частиц нелетучих анализируемых веществ рассеивает световой поток в камере рассеяния, в которой имеется стеклянный стержень, расположенный перпендикулярно световому потоку на расстоянии 2-5 мм от него. Стержень служит в качестве коллектора рассеянного света, через него часть рассеянного света попадает на фотоумножитель. В качестве источника света в устройствах данного типа чаще всего используется светодиод или полихроматическая лампа накаливания. Показания детектора прямо пропорциональны массовой скорости потока вещества, что особенно важно при использовании его с колонками малого диаметра. Вклад детектора в экстраколочное размывание 0.1-0.2 мкл. Нулевая линия стабильна даже при применении высокого градиента концентрации; однако линейный диапазон невысок (около 100). Предел детектирования для метиловых эфиров жирных кислот и триглицеридов в различных пробах около 150 нг/мл. Основным требованием является условие, чтобы анализируемые вещества не были летучими при рабочей температуре испарительной трубки температуре детектора. Детектор более чувствителен, чем рефрактометрический, сигнал не зависит от оп-

тических свойств пробы, от типа функциональных групп, от состава подвижной фазы, он обнаруживает в принципе любое вещество, менее летучее, чем подвижная фаза. Причём, основным его преимуществом перед рефрактометром является возможность его использования в режиме градиентного элюирования.

Электрозахватные детекторы. С развитием метода ВЭЖХ потребовались новые типы детекторов, обладающие высокой чувствительностью и селективностью [51,54,300]. Использование хроматографических микроколонок и капиллярных колонок с внутренним диаметром 0.5–1 мм в ЖХ с оптимальным расходом элюента 5–100 мкл/мин дало возможность прямого их соединения с газохроматографическими детекторами такими, как электрозахватный детектор, пламенно-ионизационный и пламенно-фотометрический.

Особенно перспективно использование электрозахватного детектора в связи с его широким применением для анализа пестицидов, высокой чувствительностью и селективностью, а также относительной нечувствительностью к углеводородам, часто используемым в качестве растворителей в ВЭЖХ. Выход хроматографической колонки может быть непосредственно соединен с детектором с помощью капилляра длиной 40–50 мм и внутренним диаметром 0.1 мм, вставленного в специальную переходную втулку. Втулка устанавливается на основание детектора вместо газохроматографической колонки и герметизируется с помощью уплотнения и накидной гайки. В качестве элюентов можно применять *n*-гексан и *n*-гептан. Оптимальный расход дополнительного потока азота с точки зрения максимальной чувствительности при сохранении максимальной эффективности разделения и температура детектора составляют 100 см³/мин и 250 °С соответственно. Так как электрозахватный детектор является концентрационным детектором, при изменении расхода азота от 20 до 300 см³/мин его чувствительность уменьшается, при этом уменьшается экстраколоночное расширение детектора. Изменение температуры детектора от 250 до 350 °С не влияет на чувствительность и эффективность анализа. Фоновый ток пропорционально возрастает с увеличением расхода элюента в интервале 10–100 мкл/мин, в то время как чувствительность и эффективность уменьшаются. Возможно добавление по-

лярного растворителя (например, 1–8% 2-пропанола) к гексану. Детектор может быть успешно применен для анализа хлорсодержащих пестицидов, экстрагированных гексаном из воды.

Специфические детекторы. В связи с ренессансом микроколоночной и капиллярной хроматографии возрос интерес к *пламенно-ионизационному детектору*, являющемуся стандартным для газовой хроматографии. Проблемы применения пламенно-ионизационного детектора в ЖХ аналогичны масс-спектрометрическому детектированию, поэтому и здесь наиболее проработаны конструкции транспортных детекторов. Необходимо перед детектированием избавиться в испарительной камере от подвижной фазы (растворителя). Проволока или другая транспортная система непрерывно проходит через камеру с высокой температурой (750 °С), где она очищается пиролизом, очищенная проволока проходит через элюент с пробой, испарительную камеру, после чего поступает в камеру, где проходит пиролиз анализируемого сорбата, поток ионов в пламени детектора дает сигнал [51,54,130,300].

Перспективным детектором является *тирохемиллуминисцентный азотспецифический детектор* фирмы ANTEK [234], основанный на озон – хемиллуминесцентном детектировании. Он чувствителен на уровне нанограммов к азотсодержащим веществам, имеет широкий линейный диапазон, превышающий стандартный на 5 порядков. Как и для пламенно-ионизационного детектора, ему необходима газовая система (кислород, инертный газ – аргон или гелий). В качестве подвижной фазы можно применять воду, спирты и растворители не содержащие азота. Детектор наилучшим образом приспособлен к микроколоночной ЖХ, но позволяет работать и на стандартных колонках при расходе подвижной фазы до 1 мл/мин.

Еще одним новым способом детектирования в ЖХ является атомно-эмиссионное детектирование. Принцип работы *атомно-эмиссионного детектора* заключается в деструкции молекул сорбата до свободных атомов, обладающих избыточной энергией, и регистрации атомно-эмиссионных спектров элементов при переходе возбужденных атомов в основное электронное состояние. Атомизация осуществляется в плазме, создаваемой в ячейке детектора. Для избирательного удаления подвижной фазы требуется тер-

мораспыление. Метод детектирования уже нашел применение при анализе высококипящих металлоорганических соединений.

ЯМР-спектрометрический детектор. В [309,379-380] представлена литература, посвященная комбинированию ВЭЖХ с ядерным магнитным резонансом (ЯМР). Этот метод позволяет объединить эффективное хроматографическое разделение с максимальной структурной информацией. В [309,379-380] приведены примеры использования этого комбинированного метода в анализе пищевых продуктов, в фармацевтике, биологии и медицине. Определенные ограничения накладываются на применение недеирированных растворителей в качестве элюентов, так как дейтерированные растворители достаточно дорогие. Разработанная техника подавления сигналов растворителя не сочетается с градиентным режимом хроматографии.

ГЛАВА 4.

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СОРБАТОВ

При выборе условий хроматографического разделения смеси веществ (подвижной и неподвижной фазы, метода детектирования и т.д.) необходимо исходить, в первую очередь из физико-химических свойств разделяемых соединений. К таким свойствам следует отнести их молекулярную массу, полярность, растворимость, оптические, флуоресцентные, рефракционные и электрохимические свойства, способность к тем или иным межмолекулярным взаимодействиям, позволяющим реализовать обратимую и селективную сорбцию.

Для разделения сорбатов с молекулярной массой 10^2 - 10^3 могут быть подобраны подходящие режимы хроматографирования практически в любом варианте ЖХ. Для олигомеров и полимеров с $M=10^3$ - 10^6 предпочтительны эксклюзионная, многомерная и гидродинамическая хроматография, а при наличии ионогенных структур в разделяемых полимерных и супрамолекулярных частицах благоприятные условия разделения могут быть найдены в ионной хроматографии, электрохроматографии и электрофорезе. На рис. 4.1.-4.3 представлены предварительные схемы выбора условий ЖХ, основанные на молекулярной массе, полярности сорбата и его растворимости в воде и ряде органических растворителей [78, 327].

4.1. Полярность и гидрофобность сорбатов как критерии выбора условий разделения

Полярность разделяемых веществ непосредственно сказывается на их растворимости в растворителях различных классов, поэтому она служит первым критерием выбора. Одновременно следует иметь в виду, что часто возможно решение одной и той же задачи на сорбентах различных типов и что сорбционные свойства материала иногда могут радикально изменяться в зависимости от характера подвижной фазы.

Под полярностью понимают, в первую очередь наличие в структуре молекулы неионогенных и ионогенных полярных групп ($-\text{NO}_2$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})\text{R}$, $-\text{OH}$, $-\text{CN}$, $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$, $-\text{SO}_3\text{H}$ и др.). При этом имеет

значение не только наличие полярных групп, но и их относительно высокая массовая доля в молекуле, направление и характер индуктивных и мезомерных электронных эффектов. Чем меньше относительная доля углеводородного фрагмента, чем полярней группы, чем их больше в молекуле, чем выше дипольный момент, тем полярней сорбат.

Для общей упрощенной характеристики структурных параметров аналитов и оценки баланса их гидрофильных и гидрофобных свойств автор этой книги чаще всего использует параметр H – критерий гидрофобности Шатца, который основан на том, что размер молекул аналита определяется, в первую очередь, числом атомов углерода, а снижение гидрофобности при введении в его молекулу полярной функциональной группы определяется для полифункциональных соединений не столько специфической гидрофильностью группы, сколько самим фактом ее наличия [13].

$$H = n_h - 4\sqrt{n_f}, \quad (4.1)$$

где n_h – число элементарных гидрофобных фрагментов в молекуле, т. е. сумма атомов углерода и галогенов, а n_f – число полярных групп. Было принято допущение, что каждый атом галогена эквивалентен по своему влиянию на гидрофобность вещества как одна метиленовая группа, а атомы серы в тиоэфирах и меркаптанах не повышают и не снижают гидрофобности молекулы в целом. Полярные группы, расположенные в непосредственном соседстве, рассматриваются как одна полярная группа. Конечно же, гидрофобность атомов галогенов и серы сильно зависит от характера остальной части молекулы, и полярность функциональных групп в соответствии с теорией химического строения Бутлерова чувствительна к их взаимному расположению. Поэтому подчеркнем, что критерий H не претендует на детальное описание гидрофобности в узких группах веществ, мало отличающихся по структуре, а предлагается в качестве универсальной меры гидрофобности для сравнительного описания веществ, сильно отличающихся по строению. Иначе говоря, этот критерий пригоден, в первую очередь, при использовании приема широкого обобщения. Шатцем и Сахартовой показано в [13], что величина H линейно коррелирует с параметром

$\log P$ (логарифмом коэффициента распределения вещества в системе октан-1-ол – вода). Коэффициент корреляции для рассмотренного им массива данных составил $R=0.917$. Разброс точек обусловлен положительными или отрицательными отклонениями от аддитивной модели учета полярных функциональных групп. Чем удаленней друг от друга полярные группы, тем лучше соблюдается аддитивность. Что касается гомологических рядов, то для них n_f – величина постоянная, а значит, изменение гидрофобности связано только с числом атомов С, так как число атомов галогенов равно по определению. Разветвленность, насыщенность, наличие циклов в углеводородном радикале параметр H также не учитывает, что является еще одной причиной ухудшения корреляции.

Наряду с экспериментальным методом определения коэффициента распределения в системе октан-1-ол – вода, введенным в научный обиход Ганчем и Лео, как мера гидрофобности органических соединений [381,382], разработаны методы априорного расчета $\log P$ по вкладам атомов, структурных фрагментов и функциональных групп. В биохимии, фармацевтической отрасли активно используются расчетные значения $\log P$. Методы расчета заложены в ряде химических программ, например, в программе CS ChemOffice 2002, разработанной корпорацией CambridgeSoft Corporation [123]. Один из методов базируется на статистических данных о 94 структурных вкладах в гидрофобность, оцененных методом наименьших квадратов для 830 соединений. Стандартное отклонение в оценке составляет 0.47 единиц $\log P$. Метод позволяет обработать молекулы, содержащие водород, кислород, азот, серу и галогены. Второй метод – расширенная версия первого метода, базируется уже на 120 структурных вкладах, статистически оцененных методом МНК в 893 молекулах. В дополнение к атомам, представленным в первом методе, модифицированный алгоритм может обработать молекулы, которые содержат атомы селена и фосфора. В этом случае точность расчета характеризуется стандартным отклонением 0.50 единиц $\log P$. Третий метод базируется на 222 атомных вкладах, вычисленных по экспериментальным данным для 1868 молекул. Этот метод позволяет вычислять $\log P$ со стандартным отклонением 0.43 единиц $\log P$ и может обработать молекулы, содержащие водород, кислород, азот,

серу, галогены и атомы фосфора. Если этот метод применять к молекулам с внутренними водородными связями, стандартное отклонение выше (0.83 единиц $\log P$). Корпорация BioByte запатентовала оригинальный алгоритм расчета $\log P$, основанный на современных квантовохимических представлениях и принципах, и установленных химических взаимодействиях в органических молекулах. В этом алгоритме, построенном не на статистических данных, а на квантовохимических моделях, учитывается возможность образования внутримолекулярных водородных связей, индуктивный и мезомерный электронные эффекты и стерический фактор, влияющие на гидрофобность соединения. Для того чтобы отличать расчетные величины логарифма коэффициента распределения, полученные по указанному алгоритму, их обозначают, как $C\log P$. Расчет величин $C\log P$ для различных химических структур является стандартной процедурой в фармацевтической химии, в токсикологии и экологической оценке опасности соединения, в скрининге веществ на биологическую активность. При наличии специализированного программного обеспечения компьютерные расчеты $\log P$ и $C\log P$ не вызывают затруднений. Привлекательность упрощенного критерия Шатца H заключается в том, что, в отличие от сложных алгоритмов расчета $\log P$ и $C\log P$, произвести его оценку можно даже на калькуляторе. При этом он тесно коррелирует с указанными критериями гидрофобности. Кроме того, программы не пригодны для расчета $\log P$ и $C\log P$ для высокогидрофобных веществ, например, липидов, каротиноидов, ПАВ, производных фуллерена и т.д.

В табл. 4.1 приведены примеры значений H , $\log P$ и $C\log P$ для ряда широко известных органических соединений природного и синтетического происхождения. Как показали расчеты, параметр H органических соединений с молекулярной массой от 30 до 900 варьирует в пределах от -4.0 до 60-70. Органические соединения с отрицательными значениями $H=-4.0-0$ и близкими к нулю (<0.5) или отрицательными значениями $\log P$ и $C\log P$ можно отнести к гидрофильным соединениям. Они неограниченно или частично растворяются в воде, а значит, для их хроматографии пригодны водосодержащие ПФ. Сорбаты с $H=0-4.0$ (величины $\log P$ и $C\log P$ равны 0.5-2.0) обозначим низкогидрофобными. Последние, как правило, хорошо растворяются в

полярных растворителях и плохо в гексане. Функциональные производные углеводородов с $M=100-500$ имеют гидрофобность H порядка 4.0-20 (величины $\log P$ и $C\log P$ равны 2.0-6.0), их полярность существенно зависит от характера полярных групп и их взаимного расположение, априорно предсказать по величине H их способность растворяться в тех или иных растворителях затруднительно. Статистически наблюдается общая тенденция – с увеличением величины H растворимость в воде понижается, повышается растворимость в универсальных и неполярных растворителях. *Высокогидрофобные соеди-*

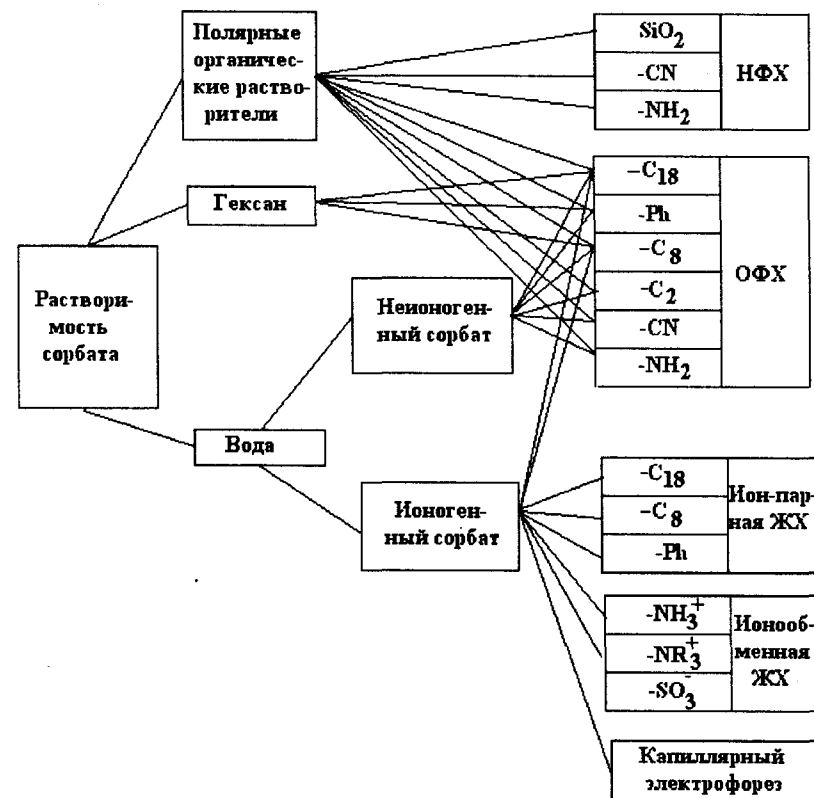


Рис. 4.1. Схема выбора неподвижной фазы для разделения низкомолекулярных органических соединений, исходя из их растворимости в неполярных и полярных растворителях и в воде

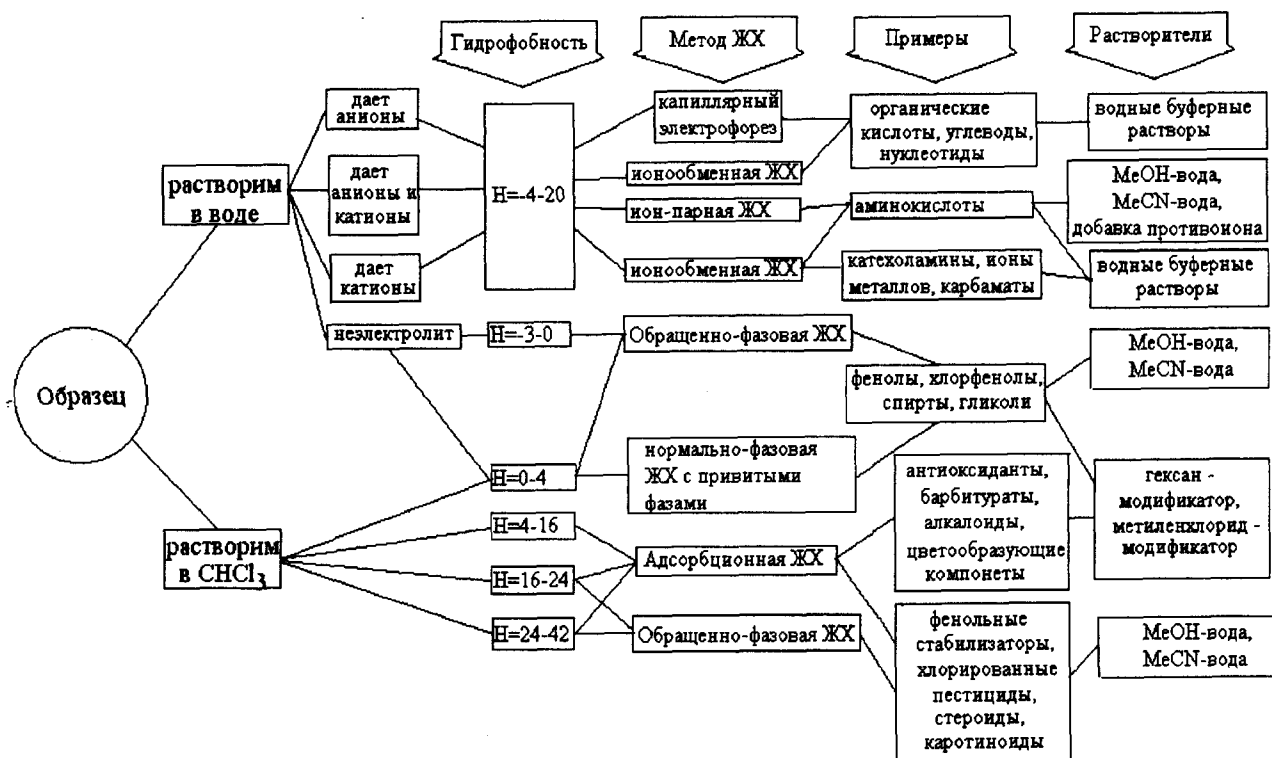


Рис. 4.2. Выбор условий ВЭЖХ с учетом гидрофобности аналита

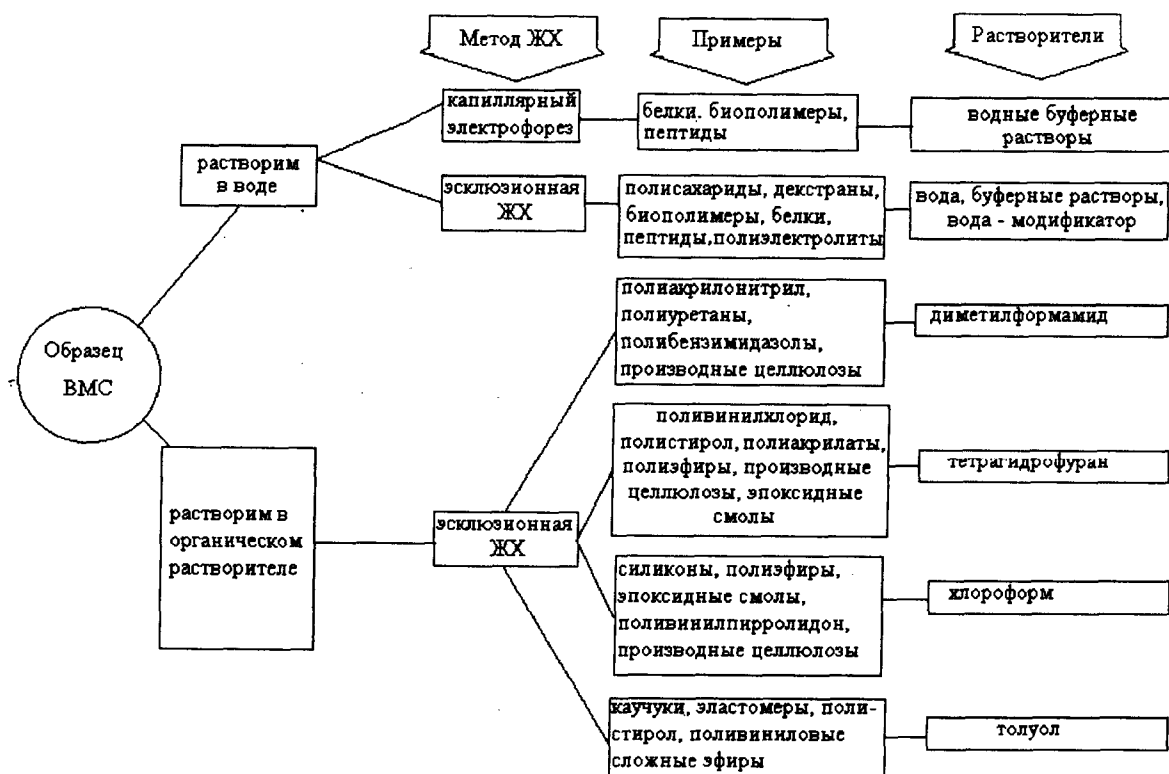


Рис. 4.3. Выбор варианта ВЭЖХ для разделения полимеров

нения с $H=20-60$ (величины $\log P$ и $ClogP > 6.0$) практически не растворяются в воде, а нередко – и в гексане. Для них характерна повышенная растворимость в малополярных растворителях, из которых особо выделяются тетрагидрофуран и хлороформ. Эти же растворители растворяют и многие высокомолекулярные соединения, в элементарных звеньях которых имеются малополярные группы.

Следует отметить, что для высокогидрофобных соединений расчеты $\log P$ и $ClogP$ невозможны, их можно определить только экспериментально. Например, известное программное обеспечение не рассчитывает логарифм константы распределения для триглицеридов высших карбоновых кислот, каротиноидов и т.д.

Расчет величины гидрофобности H для высокомолекулярных полимеров по формуле (4.1) теряет актуальность. Если оценивать гидрофобность только элементарного звена H для гомополимеров или усредненную гидрофобность элементарного звена для гетерополимеров, можно условно разделить полимеры на гидрофобные и гидрофильные. Так, для полисахаридов, полипептидов, нуклеиновых кислот, полиэлектролитов элементарные звенья имеют отрицательные значения H , такие полимеры могут растворяться в воде, водных растворах солей, кислот и оснований, т.е. их следует отнести к гидрофильным полимерам. Такие полимеры хроматографируют водными подвижными фазами. Полимеры с положительной величиной H элементарного звена однозначно гидрофобны и способны растворяться в универсальных или малополярных растворителях, для их разделения применяют эксклюзионную хроматографию при помощи неводных элюентов.

4.2. Строение и растворимость сорбатов

В связи с особой важностью растворимости образца в выборе метода хроматографического разделения, остановимся на ней подробнее. Растворимость сорбата – его способность образовывать с тем или иным растворителем растворы. Количественно она характеризуется максимальным количеством вещества, способным раствориться в данном растворителе при определенной температуре и давлении, т.е. концентрацией насыщенного раствора данного веще-

ства в данном растворителе. Наименее полярные органические соединения – углеводороды, их галогенпроизводные, а также кислородсодержащие соединения с большими алифатическими радикалами, как правило, хорошо растворимы в гексане, базовом растворителе для НФХ. Вещества этой группы довольно слабо удерживаются силикагелем, и для их хроматографии потребовались бы абсолютно неполярные подвижные фазы. Однако силикагель медленно уравнивается такими растворителями, и получить достаточно стабильные величины удерживания непросто. Поэтому для сорбатов этого типа можно рекомендовать обращенно-фазовую ЖХ.

В качестве ПФ в этом случае необходимо брать растворы, содержащие 0-30% воды в ацетонитриле или метаноле, а для наименее полярных сорбатов (например, триглицеридов, восков, высших полиядерных ароматических углеводородов) – смеси ацетонитрила с хлороформом либо хлористым метилом [13,51,57]. Органические соединения промежуточной полярности и средней гидрофобности растворяются в сложных эфирах, спиртах, хлороформе. Эти вещества имеют в составе молекул функциональные группы, способные к довольно сильному взаимодействию с силанольными группами силикагеля, полярными функциональными группами химически модифицированных силикагелей. Подвижные фазы для хроматографии на этих сорбентах содержат 2-50% полярного органического растворителя в смеси с неполярными или малополярными растворителями (алканы, галогеналканы). Равновесие между силикагелем и такими растворами устанавливается быстро, и оно довольно устойчиво. Поэтому результаты хроматографии в этих условиях, как правило, хорошо воспроизводятся. Разделение на силикагеле более селективно по отношению к пространственной структуре сорбатов, в силу чего нормально-фазовая хроматография наиболее предпочтительна, если предстоит разделение изомеров.

Многие полярные (гидрофильные) органические соединения растворимы в воде, поэтому для них обычно используют ОФХ, имеющую целый ряд преимуществ перед НФХ. Подвижная фаза содержит 0-50% органического растворителя (метанол, ацетонитрил, ТГФ) в воде. Соединения выходят из колонки в порядке убывания полярности. Если сорбаты ионизированы в водных раство-

рах, с целью улучшения формы пика и воспроизводимости результатов в ПФ добавляют соли, кислоты, буферные растворы для поддержания необходимой ионной силы и pH. Для ионогенных соединений существуют и другие варианты выбора хроматографической системы. Во-первых, это ионообменная хроматография на материалах, которые по химизму взаимодействия повторяют классические иониты. Недостатком такого режима является сравнительно невысокая эффективность разделения. ПФ, как правило, представляет собой буферный раствор. Его pH и ионная сила подбираются таким образом, чтобы обеспечить желаемые значения констант сорбции.

Другой режим разделения ионогенных соединений – ион-парная хроматография. Методически суть ее сводится к тому, что в обычную обращенно-фазовую систему добавляют гидрофобные ионы, имеющие заряд, противоположный по знаку заряду разделяемых ионов. Этот прием позволяет получить пики ионогенных соединений почти идеальной формы, что редко достигается при обычной ОФХ или ионообменной хроматографии соединений данной группы. Наконец, третий наиболее перспективный метод разделения ионогенных соединений – капиллярный электрофорез.

Принципы, позволяющие прогнозировать растворимость вещества, разработаны еще недостаточно строго. Растворимость определяется физическим и химическим сродством молекул растворителя и растворяемого вещества, соотношением энергий взаимодействия однородных и разнородных компонентов раствора, характеризующим, например, с помощью так называемой, энергии взаимодействия. Если преобладает взаимодействие разнородных молекул ($\omega < 0$), растворимость относительно велика, а часто и неограничена; если преобладает взаимодействие одинаковых молекул ($\omega > 0$), растворимость обычно невелика. Как правило, хорошо растворяются друг в друге подобные по физическим и химическим свойствам вещества (“подобное растворяется в подобном”); при этом $\omega \approx 0$. Так, обычно вещества, состоящие из полярных молекул, и вещества с ионным типом связи лучше растворяются в полярных растворителях (вода, спирты, жидкий аммиак), а неполярные вещества – в неполярных растворителях (бензол, хлороформ, сероуглерод).

Таблица 4.1 Гидрофобность некоторых органических соединений

Соединения	H	logP	ClogP	Соединения	H	logP	ClogP
Адреналин	1.0	0.75	-0.38	2-нафтол	6.0	2.87	1.74
Аланин	-2.7	-2.83	-3.12	2-нафтольная кислота	7.0	2.59	3.06
Анилин	2.0	0.90	0.81	2-нафтиламин	6.0	2.27	1.99
Антрацен	12.0	4.03	4.49	Никотин	4.3	0.93	0.88
Аргинин	-0.9	-1.43	-3.52	Никотиновая кислота	0.3	0.25	0.80
Аспарагиновая кислота	-2.9	-2.33	-3.54	4-нитрофенол	0.3	1.44	1.85
Ацетилсалициловая кислота	3.3	1.21	1.02	Пальмитиновая кислота	12.0	5.77	7.21
Ацетофенон	4.0	1.35	1.58	Пирокатехин	0.3	0.91	-0.1
Бензиламин	3.0	1.06	1.09	Пикриновая кислота	0.1	1.36	1.64
Бензойная кислота	3	1.86	1.89	Пиперидин	1.0	0.6	1.39
Валин	-0.7	-0.01	-2.29	Пирогаллол	-0.9	0.87	-0.70
Галловая кислота	-1.0	0.47	-0.51	Пиррол	0	0.52	0.72
Гваякол	1.3	1.33	1.32	Резорцин	0.3	0.80	-0.1
Гидрохинон	0.3	0.56	-0.1	Сахарин	1.4	0.35	0.72
Глицерин	-3.9	-1.33	-1.54	Серин	-3.9	-1.75	-2.74
Глицин	-3.7	-1.39	-3.21	Стеариновая кислота	16.0	6.61	8.27
Глутаминовая кислота	-1.9	-1.39	-2.69	Тимол	6	3.37	2.49
Глюкоза	-2.9	-2.38	-2.42	Тиофен	4.0	1.81	1.79
2,4-динитроанилин	-0.9	0.97	1.75	Тиофенол	2.0	2.22	1.92
2,4-динитрофенол	-0.9	1.4	1.82	Тирозин	2.1	-2.15	-2.22
Дифениламин	8.0	3.44	3.62	Триптофан	4.1	-1.07	-1.57
Дибутилфталат	10.3	4.16	4.73	2,4,6-три-tert-бутилфенол	14	6.76	6.75
Диэтилфталат	6.3	2.46	2.62	Трсонин	-2.9	-1.43	-2.43
Индол	4.0	2.13	2.18	Фенилаланин	3.3	-1.49	-1.56
Ионол	12.0	5.54	5.43	Фенол	2.0	1.64	1.48
Каротин	40.0	10.84	15.23	Флороглюцин	-0.9	0.87	-0.77
Кофсин	0.0	-0.65	-0.35	Фруктоза	-2.9	-3.29	-2.83
Ксилит	-3.9	-2.4	-1.93	Фуллерен-60	60		9.18
Лейцин	0.3	-1.62	-1.67	Хинолин	8.0	2.04	2.03
Лизин	-0.9	-1.15	-3.42	4-хлорфенол	3.0	2.43	2.48
Лимонная кислота	-2.0	-1.68	-2.00	Цистеин	-2.7	-0.92	-2.35

Для предсказания растворимости неэлектролитов широкое распространение получила предложенная Гильдебрандом теория, согласно которой взаимная растворимость веществ возрастает с уменьшением разности их параметров растворимости

$$\delta = (E/V)^{1/2}, \quad (4.2)$$

где E и V – соответственно удельная энергия испарения и мольный объем компонента. Величина δ может быть найдена и по другим характеристикам чистых компонентов, а также по свойствам раствора. Для электролитов не предложено какой-либо общей теории растворимости, известны лишь некоторые эмпирические правила. Так, растворимость многих электролитов возрастает пропорционально кубу диэлектрической проницаемости растворителя; образование кристаллогидратов обычно увеличивает растворимость солей. Обычно лучше растворимы электролиты с большей склонностью к сольватации растворителем.

Поскольку мерой растворимости вещества при данных условиях служит концентрация его насыщенного раствора, численно растворимость может быть выражена теми же способами, что и концентрация, например, процентным отношением массы растворенного вещества к массе насыщенного раствора или числом молей растворенного вещества, содержащегося в 1 л насыщенного раствора. Часто растворимость выражают также числом единиц массы исходного вещества, насыщающего при данных условиях 100 единиц массы растворителя. Выраженную этим способом растворимость называют *коэффициентом растворимости*. Растворимость различных веществ в воде и органических растворителях изменяется в широких пределах. Если в 100 г растворителя растворяется более 10 г вещества, то такое вещество принято называть хорошо растворимым; если растворяется менее 1 г вещества – малорастворимым, и, наконец, практически нерастворимым считается вещество, если в раствор переходит менее 0,01 г вещества.

Растворение большинства твердых тел сопровождается поглощением теплоты. Это объясняется затратой значительного количества энергии на разрушение кристаллической решетки твердого тела, что обычно не полностью компенсируется энергией, выделяющейся при образовании гидратов (сольватов). Прилагая принцип Ле Шателье к

равновесию между веществом в кристаллическом состоянии и его насыщенным раствором, приходим к выводу, что в тех случаях, когда вещество растворяется с поглощением энергии, повышение температуры должно приводить к увеличению его растворимости. В относительно редких случаях, когда энергия сольватации (гидратации) настолько велика, что образование раствора сопровождается выделением энергии, растворимость с ростом температуры понижается [312].

Повышение температуры используют в ЖХ плохо растворимых при комнатной температуре веществ для повышения эффективности разделения, снижения риска механического засорения хроматографического тракта и, в частности, колонки из-за плохой растворимости сорбата в подвижной фазе и необратимой сорбции на сорбенте. При плохой растворимости сорбата могут наблюдаться артефакты уширения и раздвоения хроматографического пика.

Количественную или качественную информацию о растворимости органических веществ в некоторых неполярных и полярных растворителях можно почерпнуть в химических справочниках [313-320]. Если вещество редкое и информация о его растворимости малодоступна, то для целей ЖХ достаточно оперативного качественного определения растворимости в хроматографических растворителях. В бюкс, с примерно 0,02 г вещества надо внести 2 мл растворителя, перемешать пробу, если вещество не растворялось при комнатной температуре, нагреть бюкс в водяной бане. По итогам наблюдений сделать заключение, что образец хорошо растворим, мало растворим (растворим только при нагревании) или практически нерастворим.

Растворимость аналита в хлороформе и ТГФ включена в перечень важнейших критериев выбора варианта ВЭЖХ [57].

В [327,321-325] в алгоритм подбора условий ВЭЖХ предлагается включить качественное определение растворимости образца не только в воде, гексане, метаноле и ацетонитриле, но и в шести других наиболее часто применяемых растворителях. В десятку типовых растворителей, наряду с вышеупомянутыми, добавлены этанол, пропан-2-ол, ТГФ, этилацетат, хлороформ и диоксан. Эти растворители можно разбить на гидрофильные (совместимые с водой), гидрофобные (совместимые с гексаном) и универсальные (совместимые и с водой, и с гексаном). К первым можно отнести аце-

тонитрил и спирты, ко вторым – хлороформ, этилацетат, к последним – пропан-2-ол, ТГФ, диоксан.

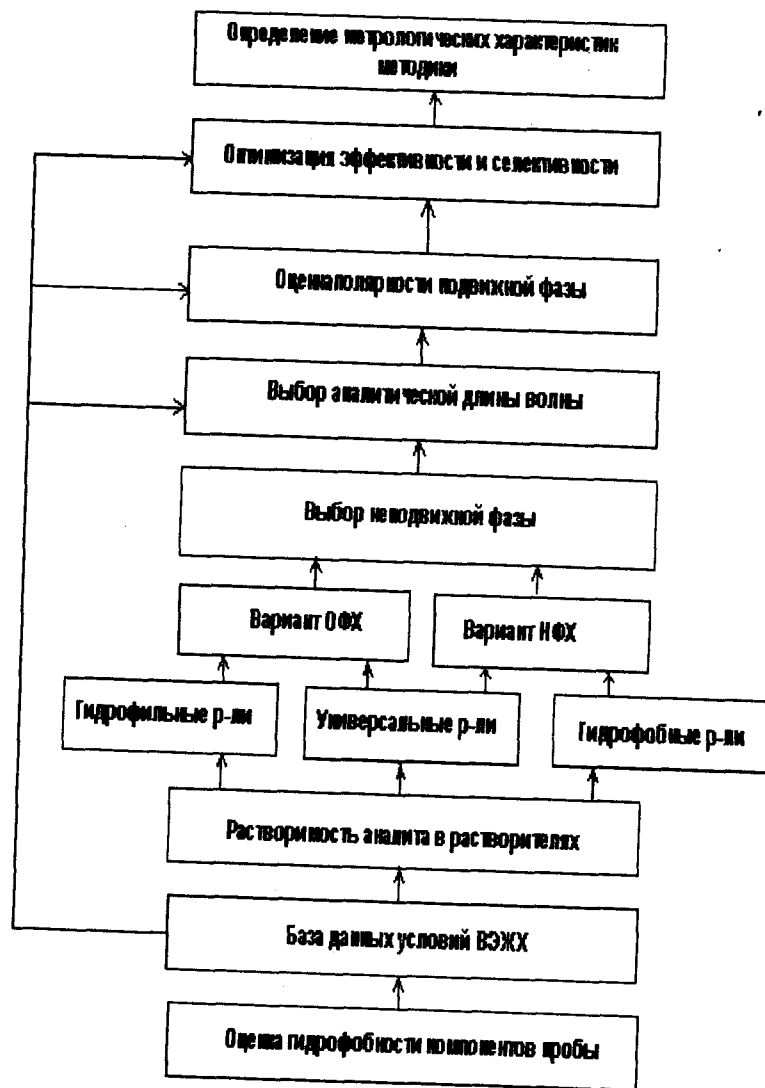


Рис. 4.4. Схема выбора оптимальных условий разделения методом ВЭЖХ, основанная на гидрофобности аналита и его растворимости в гидрофильных, универсальных и гидрофобных растворителях

В соответствии с этим алгоритмом (рис.4.4) на первом этапе рассчитывается критерий гидрофобности определяемых компонентов, далее из базы данных, созданной в табличном процессоре, извлекают выборку условий ВЭЖХ соединений с такими же или близкими значениями критерия H , исходя из принципа “подобное хроматографировать в подобных условиях”. Затем экспериментально на качественном уровне находят растворимость аналитов в типичных растворителях и делают выбор между ОФХ и НФХ. По данным об оптических свойствах аналита выбирают условия детектирования. Исходя из эмпирических данных о параметрах удерживания аналитов от полярности ПФ, выбирают первоначальный состав ПФ, после чего экспериментально оптимизируют селективность или эффективность разделения. На этом этапе возможно использование программ, симулирующих хроматографические системы, например, широко известную программу DryLab 2000 Plus, которая позволяет прогнозировать с достаточно хорошей вероятностью селективность разделения в выбранном варианте системы сорбат – сорбент – элюент по ограниченному набору экспериментальных параметров удерживания аналитов, входящих в состав анализируемой пробы [483]. Применение данного алгоритма на практике позволяет заметно сократить время и реактивы для получения надежной хроматографической методики.

Итак, критерий гидрофобности H , отличающийся простотой и универсальностью, характеризует сорбат в первичном отборе условий хроматографии. Чем выше гидрофобность сорбата, тем предпочтительней НФХ. Чем выше гидрофобность сорбата, тем меньше должна быть концентрация воды в обращенно-фазовом варианте ЖХ.

В режиме НФХ необходимо находить компромиссное решение между плохой растворимостью в гексане и желательным значением фактора удерживания. Как показывает опыт [321-325], для улучшения растворимости сорбата следует использовать ПФ, в которых к гексану добавляется большое количество (объемная доля 0.1-0.3) малополярного модификатора (хлороформа, диоксана, этилацетата). Иногда при наличии хорошей растворимости в гексане высокогидрофобных веществ предпочтение следует отдавать ПФ из одного растворителя, чтобы получить приемлемые параметры удерживания.

Применение критерия гидрофобности H по принципу “подобное хроматографировать в подобных условиях” является, конечно, вариантом широкого обобщения, в котором найдется много исключений. Вместе с тем этот принцип позволяет сразу отсеять заведомо неблагоприятные условия анализа. В [13] приведена база данных для более чем 600 лекарственных веществ, где наряду с условиями ВЭЖХ (сорбент, состав подвижной фазы, детектор) указаны величины H основного компонента в разделяемой смеси. Если имеется возможность рассчитывать величины $\log P$ и $C\log P$, принцип Шатца применим и в этом случае. Коэффициенты распределения в системе октан-1-ол – вода, безусловно, более точно определяют гидрофобно-гидрофильный баланс в структуре аналита. Кроме того, к настоящему времени получена большая база не расчетных, а экспериментальных значений $\log P$ для большого числа органических соединений. В то же время существуют обширные базы данных, в которых собраны условия ВЭЖХ различных веществ. Целесообразно объединять эти базы. Данные о гидрофобности анализируемых компонентов позволяют структурировать хроматографическую информацию по одному из важнейших признаков аналита – его способности взаимодействовать с полярными и неполярными растворителями.

Рассчитать количественно гидрофобность полимерных анализов для выбора условий эксклюзионной ЖХ не представляется возможным из-за отсутствия четких критериев. Можно говорить только об их растворимости в воде, гидрофильных или гидрофобных растворителях. Сравнительно низкомолекулярные полимеры хорошо растворяются ТГФ, 1,1,2,2-тетрахлорэтаном и хлороформом. В табл. 4.2. приведены данные о растворимости полимеров в 10 наиболее ходовых растворителях, используемых для гель-проникающей хроматографии, а в табл. 4.3. даны диапазоны рабочих температур этих растворителей. Во избежание мицеллообразования, для повышения растворимости высокомолекулярных фракций полимеров, а также для понижения вязкости подвижной фазы целесообразно повышать рабочую температуру колонки.

Еще сложнее ситуация обстоит с растворимостью у блочных сополимеров, которые содержат блоки с различной лиофильностью. Для них не всегда удается подобрать моnorазтворитель, хо-

рошо растворяющий блоки, имеющие разные по природе функциональные группы. В этом случае необходимо применять эмпирически подобранные смеси селективных растворителей, хорошо растворяющих соответствующие гомополимеры.

Таким образом, способность растворять аналит является ключевым свойством подвижной фазы. Если анализируемые компоненты не растворяются в базовом растворителе для того или иного метода ЖХ (в воде или гексане), это не означает, что их хроматография в режиме ОФХ или НФХ невозможна. Растворимостью можно управлять, меняя состав подвижной фазы. Достаточно добиться состояния хотя бы малой растворимости, так как концентрация сорбата в пробе может быть весьма низкой. Для этой цели в разбавитель добавляют модификатор или смесь модификаторов. Второй способ увеличения растворимости – повышение температуры, для этого целесообразно наличие в хроматографе термостата хроматографического тракта.

Табл. 4.2. Растворимость некоторых полимеров в разных растворителях

Полимеры	В	ДМФА	ТГФ	ТФЭ	МК	ХФ	ТХЭ	ТЛ	ТХБ	ДК
Биополимеры	+									
Каучуки						+		+		
Полиакрилаты			+				+			
Полиамиды				+	+					
Полиакрилонитрил		+								
Поливиниловый спирт	+	+								
Поливинилхлорид		+	+							
Поливиниловые сложные эфиры			+					+		
Полиолефины									+	+
Полистирол			+					+		
Полиуретаны		+			+					
Производные целлюлозы	+	+	+							
Полиэлектролиты	+									
Полиэфиры			+		+	+				
Силиконы						+	+	+		
Эпоксидные смолы			+			+				

Примечание: ТФЭ – трифторэтанол; МК – мета-крезол; ТХБ – 1,2,4-трихлорбензол; ТХЭ – 1,1,2,2-тетрахлорэтан; ТЛ – толуол, ДК – декалин.

Табл. 4.3. Свойства растворителей для хроматографии полимеров

Растворитель	В	ДМФА	ТГФ	ТФЭ	МК	ХФ	ТХЭ	ТЛ	ТХБ	ДК
Диапазон рабочей T , °C	20-65	20-85	20-45	20-40	30-135	20-30	20-100	20-70	130-160	135
Гирофобность, H_S	-4.0	-1.0	0	1.0	3.0	4.0	6.0	7.0	9.0	10.0

При растворении полимеров следует учитывать лиофильные свойства мономерного звена, наличия функциональных групп, имеющих повышенное сродство к тому или иному растворителю. Значение имеет не только функциональность, но и молекулярная масса.

4.3. Оптические свойства и аналитические длины волн

Способность сорбата поглощать излучение в ультрафиолетовом (190-360 нм) и видимом диапазоне (360-800 нм) электромагнитного спектра определяет возможность применять при его хроматографировании спектрофотометрических и флуориметрических детекторов. Видимую область можно подразделить на цветовые диапазоны: красный, (714-625 нм); желтый (624-499 нм); зеленый (500-476 нм); синий (475-401 нм) и фиолетовый (400-361 нм).

Количественные измерения сигнала детектора основаны на законе Бера – Ламберта – Бугера

$$A = -\lg T = \epsilon bc, \quad (4.3)$$

где A – поглощение вещества, или его оптическая плотность; T – пропускание образца, т.е. отношение интенсивности света, прошедшего через образец, к интенсивности падающего монохроматического света, l , b – длина оптического пути или толщина слоя жидкости в оптической ячейке (обычно $b=1$ см при диаметре светового канала около 0.1 см и рабочем объеме ячейки около 8 мкл); c – концентрация (моль/л), ϵ – молярный коэффициент экстинкции, л/(моль·см), который является индивидуальной характеристикой вещества для каждой длины волны.

Для регистрации хроматографического пика необходимо, чтобы сорбат имел достаточно интенсивное поглощение при длинах волн больших, чем предел пропускания подвижной фазы. *Предел пропускания* – длина волны, при которой оптическая плотность (поглощение) некомпенсированного слоя растворителя толщиной 1 см достигает 1.0 [135]. Наиболее прозрачные элюенты, приготовленные из спектрально чистых растворителей имеют предел пропускания в области 190-210 нм. Чаще всего обеспечивается предел пропускания подвижной фазы до 230 нм, так как детектирование достаточно большого количества практически значимых сорбатов проводят в области ≥ 254 нм. Если сорбат поглощает в видимой области, для его элюирования пригодны ароматические растворители, отличающиеся рядом превосходных хроматографических свойств, но имеющих интенсивное поглощение в области 254-290 нм.

Ниже, в табл. 4.4. – 4.11., приведены данные по максимумам поглощения наиболее важных классов органических соединений, по которым можно ориентироваться при выборе аналитической длины волны [135, 327-330]. Следует иметь в виду, что в зависимости от состава растворителей возможны сдвиги полосы поглощения веществ с несопряженными хромоформными группами на несколько нм (1-11 нм). *Батохромный (красный) сдвиг* – сдвиг полосы в сторону длинных волн. Увеличение длины хромоформной системы приводит к снижению энергии возбуждения, что в свою очередь вызывает батохромный сдвиг максимума поглощения. *Гипсохромный (синий) сдвиг* – сдвиг полосы в сторону коротких волн. Изменение состава смешанных растворителей может так же привести к *гиперхромному и гипсохромному эффектам* – соответственно повышению или понижению молярной экстинкции (молярной поглощательной способности вещества). *Хромофор* (носитель цветности) – группа атомов, либо система электронов в молекуле, которые главным образом обуславливают поглощение света в конкретном оптическом диапазоне спектра. Характерная структурная особенность хромофоров – наличие у них группировок, содержащих двойные связи. К этим группам относятся азогруппа, нитрозогруппа, оксогруппа, этенильная группа и нитрогруппа. Некоторые из них являются сильными хромофорами (азогруппа), другие – очень слабыми (ок-

согруппа). К сложным хромофорным группам относятся системы сопряженных двойных связей, например, хиноидные структуры.

Наряду с хромофорами в состав молекул могут входить *ауксохромы* (от греческого “ауксо” – увеличение) – функциональные группы, которые сами по себе не поглощают в УФ- или видимой области, но при сопряжении с хромофором вызывают красный сдвиг его полосы поглощения и гиперхромный эффект. Ими являются аминогруппы, гидроксигруппы, сульфогруппы, карбоксилы и некоторые другие [135].

Ациклические диены имеют поглощение в области 214-217 нм, гетероаннулярные диены – 217 нм, гомоаннулярные – 253 нм. Положение максимума мало зависит от природы растворителя. При расширении системы сопряжения наблюдается аддитивный красный сдвиг – 30 нм на каждую двойную связь. Например, каротиноиды с 11 сопряженными кратными связями поглощают в области 460-500 нм. Так, ликопин имеет в гексане три максимума поглощения 448, 472 и 504 нм. Аддитивная схема дает $214 + 9 \cdot 30 = 484$ нм, что соответствует средней полосе ликопина в хлороформе. Галогены (Cl, Br) дают аддитивный сдвиг 17 нм, диалкиламиногруппа – 60 нм.

Карбонилсодержащие соединения $R_2C=CR'-C(O)R''$ поглощают при 210-255 нм, расширение системы сопряжения по заместителю R' приводит к батохромному сдвигу 30 нм на каждую кратную связь, алкоксигруппы смещают на 30-35 нм каждая, галогены – на 12-30 нм, диалкиламиногруппа в положении R' дает положительный сдвиг 95 нм. В воде по сравнению с органическими растворителями, аддитивный эффект на 8-19 нм меньше прогнозируемого. При прогнозе аналитической длины волны для *орто*-, *мета*- и *пара*-замещенных алкилфенилкетона, бензальдегида, бензонитрила, бензойной кислоты и ее сложных эфиров исходят из главной полосы переноса электрона (*K*-полосы). Каждая исходная молекулярная система имеет определенный максимум. Чтобы найти, например, аналитическую длину волны *пара*-аминобензойной кислоты, берем исходное значение максимума поглощения 230 нм и прибавляем к нему величину аддитивного сдвига соответствующего заместителя (NH_2 в *пара*-положении), получаем значение аналитической длины волны $230 + 58 = 288$ нм. Обращает на себя внимание тот факт, что заместители в *пара*-положении приводят к максимальному батохромному сдвигу.

Таблица 4.4. Полосы поглощения несопряженных хромофоров в неполярных растворителях [135,328]

Соединение	λ_{max} , нм
R-OH	180-185
R-Cl	170-175
R-Br	200-210
R-I	225-260
R-CH=CH ₂	163, 174
R-C=CH	185, 223
R-COCl	235, 280
R-C(O)OH, R-C(O)OR	195-210
R-C(O)NH ₂	175 (214 в воде)
R-CN	170
R ₃ N	199, 227
RC(O)NHC(O)R	230-240
R-NO ₂	270-280
R-NO	600-650, 300
R-N=N-R	347-370
R-CHO	290
R-C(O)-R	270-290, 180-190
R-SH	192, 225
R-S-R	210, 229
RSO ₂ R	<190

Таблица 4.5. Поглощение ароматических соединений [135, 328]

Соединение	λ_{max} , нм	Растворитель
Бензол	204, 256	Циклогексан
Нафталин	190, 220, 286, 312	Этанол
Антрацен	221, 256, 375	Циклогексан
Азулен	193, 236, 269, 357	Циклогексан
Фенантрен	222, 252, 292, 345	Циклогексан
Хинолин	228, 270, 315	Циклогексан
Изохинолин	218, 265, 313	Циклогексан
Акридин	250, 358	Этанол
Пиридин	195, 251, 270	Гексан
Пиримидин	243, 298	Циклогексан
Пурин	220, 263	Вода
Пиррол	210, 240	Гексан
Фуран	205	Гексан
Тиофен	231	Гексан
Индол	225, 265	Этанол

Таблица 4.6. Поглощение монозамещенных производных бензола Ph-R

Заместитель R	λ_{max} , нм	Растворитель
ОН	210,5, 270	Вода
O ⁻	235, 287	Вода
OCH ₃	217, 269	Вода
NH ₂	230, 280	Вода
NH ₃ ⁺	203,254	Вода
NO ₂	252,280,330	Гексан
CHO	244, 280, 328	Этанол
COOH	230,270	Вода
COO ⁻	224,268	Вода
C(O)CH ₃	240, 278, 319	Этанол
CN	224,271	Вода
F	204,254	Этанол
Cl	210,264	Вода
Br	210,261	Вода
I	207,257	Вода
CH ₃	207,261	Вода
CH=CH ₂	244,282	Этанол
C ₆ H ₅	246	Этанол

В табл. 4.8. приведены аналитические длины волн, используемые для прямого детектирования ряда природных и синтетических соединений [12,13,327]. Они не всегда соответствуют максимумам поглощения, а являются оптимальным, компромиссным решением для анализа той или иной природной смеси в конкретной подвижной фазе. Подвижные фазы охарактеризованы в самых общих чертах, приведены наиболее часто применяемые системы, без детализации состава. Прямое детектирование биогенных аминов, аминокислот, жирных кислот, фосфолипидов, углеводов, некоторых гликозидов затруднено, так как они имеют низкую интенсивность поглощения, причем в коротковолновом УФ свете. Это приводит к уменьшению чувствительности детектирования, к необходимости применения дорогих растворителей с высокой степенью отчистки от примесей, поглощающих в УФ свете. Для увеличения чувствительности спектрофотометрического детектирования и смещения длины аналитической длины волны в область, свободную от влияния растворителя, применяют предварительную дериватизацию данных соединений (табл.4.9.).

Дериваты имеют интенсивное поглощение в УФ или видимой области или флуоресцируют, что позволяет контролировать хроматографический процесс дериватизированных соединений с помощью флуориметрического детектора.

В приведенных выше таблицах указаны аналитические длины волн ряда экотоксикантов, антропогенных химических соединений и фармацевтических препаратов широкого применения. В [12,13,32] даны условия анализа более 1000 фармацевтических препаратов, большинство из которых поддается спектрофотометрическому детектированию. Электронные спектры органических веществ приобретают в количественной ВЭЖХ еще большую актуальность в связи с внедрением в аналитическую практику фотодиодных матричных детекторов, позволяющих получать либо спектр хроматографического пика, либо хроматограмму в поливолновом режиме, либо трехмерную спектрохроматограмму, в которой по одной оси откладывается время удерживания, по другим – оптическая плотность и длина волны.

Таблица 4.7. Аддитивные сдвиги (нм) для производных бензола: алкил-фенонов (246 нм), бензальдегида (250 нм), бензонитрила (224 нм), бензойной кислоты и бензоатов(230 нм)

Заместитель	<i>орто</i>	<i>мета</i>	<i>пара</i>
R (алкил,циклоалкил)	3	3	10
ОН, OR	7	7	25
O ⁻	11	20	78
Cl	0	0	10
Br	2	2	15
NH ₂	13	13	58
CH ₃ CONH	20	20	45
NHR			73
NR ₂	20	20	85

Таблица 4.8. Аналитические длины волн природных соединений при прямом детектировании

Соединения	λ , нм	Растворитель
Аминокислоты	200, 210, 215	Буферные растворы
Фенилаланин	257	Буферные растворы, pH=pI
Тирозин	275	Буферные растворы, pH=pI

Продолжение таблицы 4.8.

Соединения	λ , нм	Растворитель
Триптофан	279	Буферные растворы, pH=pI
Пептиды и белки	200-220	Буферные растворы
Хлорофиллы	654, 445, 440, 430, 380	Метанол – вода
Нуклеозиды	240, 254, 260	Буферные растворы
Каротиноиды	290, 380, 436, 440, 445, 480	Метанол – вода, гексан - модификатор
Жирные кислоты и их эфиры	205, 215, 234, 254	Метанол – вода, ацетонитрил – вода, гексан – модификатор
Триглицериды	203-213	гексан - модификатор
Эфирные масла	220	ацетонитрил – вода
Фосфолипиды	203-213	ацетонитрил – метанол – вода, гексан – модификатор
Моно-, дисахариды	190-200	ацетонитрил – вода
Пуриновые алкалоиды	280	Метанол – буферные растворы
Порфирины	400, 404	Разбавитель - этилацетат
Стероидные гормоны	230, 250, 254	Метанол – вода, ацетонитрил – вода, диоксан – вода
Жирорастворимые витамины	292, 320, 365	Метанол – вода, гексан - модификатор
Водорастворимые витамины	254	Метанол – буферные растворы, ацетонитрил – буферный растворы
Антоцианы и флавоноиды	280, 300, 520	Метанол – вода, ацетонитрил – вода – уксусная кислота
Сердечные гликозиды	220, 230, 280	Метанол – вода, ацетонитрил – вода, диоксан - вода
Нуклеозиды	254	Метанол – вода – буферный раствор

Таблица 4.9. Аналитические длины волн модифицированных производных природных соединений

Соединения	λ , нм	Модифицирующий агент	Растворитель
Аминокислоты	208, 254, 350-360	2,4-динитро-1-фторбензол	Ацетонитрил - буферные растворы
	208, 250, 254	Дансилхлорид	Ацетонитрил - буферные растворы
	436	Диметиламинофенилизотиоцианат	Ацетонитрил - буферные растворы

Продолжение таблицы 4.9.

Соединения	λ , нм	Модифицирующий агент	Растворитель
	254-269	Фенилизотиоцианат	Ацетонитрил - буферные растворы
	436	Диметиламиноазобензолсульфанилхлорид	Ацетонитрил - буферные растворы
Пептиды	436	Диметиламиноазобензолсульфанилхлорид	Ацетонитрил – диметилформамид – ацетат пиридина
Белки	280	Флуорескамин	Ацетонитрил – вода – CF ₃ COOH, пиридин – муравьиная кислота
Биогенные амины	208, 250, 254	Дансилхлорид	Ацетонитрил - буферные растворы
Жирные кислоты	254	2-бром-1-фенилэтанон	Ацетонитрил – вода
Некоторые фосфолипиды	269	4-бифенил-карбонилхлорид	Дихлорметан – метанол – NH ₄ OH
Все фосфолипиды	254-260	4-нитрофенил-карбонилхлорид	Пропан-2-ол - ацетонитрил
Гликолипиды	230	Бензоилхлорид	Гексан – модификатор
Моно-, дисахариды	230-260	Бензоилхлорид, 4-нитробензоилхлорид	Гексан – модификатор

Таблица 4.10. Аналитические длины волн для прямого анализа пестицидов, экотоксикантов и других антропогенных веществ

Соединения	λ , нм	Растворитель
Алкилбензолы	260-262	Изооктан – этанол, метанол – вода
Алкилбензолсульфокислоты	225	Буферные растворы
Анабазин	260	Метанол – вода, буферные растворы
Анилиды	254, 275	Буферные растворы
Антиоксиданты фенольного типа	254	Ацетонитрил – вода, гексан - модификатор
Афлатоксины	365	Метанол – ацетонитрил - вода
Антрацен	355	Метанол – вода, буферные растворы

Соединения	λ , нм	Растворитель
Взрывчатые вещества (гексаген, пикриновая кислота и др.)	213, 220, 280	Метанол – буферные растворы
Взрывчатые вещества (нитробензолы, нитротолуолы.)	254, 260, 330	Пропан-2-ол - вода
Галловая кислота	270	Буферные растворы
Гиббереллины	210, 240	Метанол – вода, буферные растворы
Диаминопиримидины	260, 267	Буферные растворы
2,4-динитроанилин	236	Метанол – буферные растворы
2,4-динитрофенол	293	Метанол – буферные растворы
Дифениламин	285	Гексан - модификатор
Дибutilфталат	255	Гексан - модификатор
Диэтилфталат	275	Гексан - модификатор
Металлоцианиды	214	Ацетонитрил – вода
Компоненты каменноугольной смолы, бензо(а)пирен	254	Гексан – модификатор, Ацетонитрил - вода
Консерванты (типа сорбиновой и бензойной кислот)	228, 230	Ацетонитрил – буферные растворы
Кумарин	273	Метанол – буферные растворы
Мочевина	285	Буферные растворы
Метилалкилкетоны	270, 278, 281	Изооктан - модификатор
Метилкарбаматы	206, 254	Метанол – вода
Нафтиламины	220, 235, 240	Изооктан - модификатор
Никотин	260	Буферные растворы
Нитроанилины, анилиновые красители	210, 290	Гексан - модификатор
Нитробензол	315	Гексан - модификатор
Нафтоиные кислоты	235, 280, 290	Метанол – буферные растворы
Неионогенные ПАВ	220, 280	Гексан - модификатор
Нитрозамины	230	Ацетонитрил – буферные растворы

Соединения	λ , нм	Растворитель
Нитрофенолы	254	Метанол – вода
Нитробензойная кислота	260	Гексан - модификатор
Парабены	254	Метанол – вода
Пиридин	260	Буферные растворы
Пирокатехин	278	Метанол – буферные растворы
Полиакриловые кислоты	214	Ацетонитрил – буферные растворы
Полиароматические углеводороды	254	Ацетонитрил – вода
Полистиролы	254	Тетрагидрофуран
Регуляторы роста растений	280	Ацетонитрил – буферные растворы
Резорцин	275, 290	Метанол – буферные растворы
Спиртовые экстракты марихуаны	210, 260	Метанол – буферные растворы
Стирол	246	Гексан - модификатор
Тетралин	273	Изооктан-модификатор
Тимол	274	Метанол – буферные растворы
Тиофен	235	Гексан - модификатор
Триазины	220, 254	Изооктан – пропан-2-ол
Тиокарбаматы	207, 254	Метанол – вода
Тиоцианаты, тиосульфаты	210	Буферные растворы
Тиофенол	235	Изооктан - модификатор
Урацилы	254, 270-280	Буферные растворы
Фенантрен	250	Изооктан - модификатор
Фенол	270, 273	Метанол – буферные растворы, гексан - модификатор
Фенилкарбаматы	254	Метанол – вода
Фенилмочевины	205, 237, 254	Метанол – вода, Гексан - модификатор
Феноксикарбоновые кислоты	280	Буферные растворы
Фталевые эфиры	235	Ацетонитрил – вода,
Хинолин	265	Изооктан - модификатор
Хлорорганические соединения (типа ДДТ)	254	Изооктан - этилацетат
Хлорфенолы	280	Метанол – растворы CH_3COOH
Эфиры феноксикарбоновых кислот	254	Буферные растворы

Таблица 4.11. Аналитические длины волн для прямого анализа фармацевтических препаратов

Соединения	λ , нм	Растворитель
Адреналин, норадреналин	280	Метанол - буферные растворы
Антиконкулянты	195-210	Ацетонитрил - буферные растворы
Антидепрессанты трициклические	215, 254	Гексан - этанол - дихлорметан - диэтиламин, ацетонитрил - метанол - буферные растворы
Антиаритмические препараты	254	Метанол - раствор уксусной кислоты
Антигистаминные препараты	220, 254	Гептан - 2-пропанол - дихлорметан - пропиламин, ацетонитрил - буферные растворы
Антибиотики типа тетрациклина	230, 254, 280	Тетрагидрофуран - ацетонитрил - буферные растворы
Антибиотики нитрофуранового типа	278, 365	Ацетонитрил - буферные растворы
Алкалоиды типа морфина	210, 254	Ацетонитрил - буферные растворы
Анестезирующие препараты типа лидокаина	254	Метанол - вода, Ацетонитрил - буферные растворы
Апоморфин	218	Ацетонитрил - буферные растворы
Амидопирин	254	Ацетонитрил - буферные растворы
Анальгетики, аспирин, кодеин, кофеин	220, 237, 254, 280	Метанол - буферные растворы, Ацетонитрил - буферные растворы
Антиэпилептики	210	Ацетонитрил - буферные растворы
Барбитураты	220	Метанол-вода
Бензодиазепины	254	Метанол - буферные растворы
Дионин	285	Метанол - буферные растворы

Продолжение таблицы 4.11.

Соединения	λ , нм	Растворитель
Камфора	300	Гептан - модификатор
Кортикостероиды	254	Дихлорметан - метанол
Морфин	285	Метанол - буферные растворы
Наркотики типа героина	254, 285	Ацетонитрил - вода - триэтиламин
Наркотики типа марихуаны	210, 260	Метанол - буферные растворы
Нейролептические препараты типа сульфоридазина	263	Гептан - метилхлорид - метанол - триэтиламин
Никотиновая кислота, никотинамид	262	Ацетонитрил - буферные растворы
Инсулины	280	Ацетонитрил - буферные растворы
Папаверин	254	Метанол - буферные растворы
Парацетамол	200, 214, 248, 254	Метанол - буферные растворы
Противовоспалительные препараты нестероидного типа	220, 230, 254	Ацетонитрил - буферные растворы
Противоязвенные препараты типа ранитидина	230	Метанол - буферные растворы
Простагландины	196-210	Ацетонитрил - буферные растворы
Сердечно-сосудистые препараты	220	Метанол - вода
Сульфаниламидные препараты	230-306	ацетонитрил - вода, буферные растворы
Стимуляторы типа амфетамина	254	Ацетонитрил - буферные растворы
Теобромин, теофиллин	254, 280	Ацетонитрил - вода, буферные растворы
Транквилизаторы	254	Ацетонитрил - буферные растворы

4.4. Рефракционные свойства

Сочетание рефрактометрии с высокoeffективной жидкостной хроматографией служит одним из основных средств современной аналитики. Показатель преломления является характерной для данного вещества константой и зависит от длины света, температуры и давления. Стандартными условиями измерения показателя преломления является $\lambda=589.3$ нм (D-линия натрия) при 20°C, 0.1 МПа. Например, для воды $n_D^{20}=1.3330$. Показатель преломления большинства чистых, смешанных растворителей и жидких растворов находится в пределах $n_D^{20}=1.30-1.90$. Показатель преломления > 1.60 считается высоким, а < 1.40 – низким. Коэффициент преломления разбавленных растворов изменяется пропорционально изменению концентрации растворенного соединения, что позволяет использовать рефракцию для количественного обнаружения сорбатов в элюате.

Современные рефрактометрические детекторы фиксируют Δn $1 \cdot 10^{-8}$. Температурная зависимость показателя преломления лежит в пределах $\Delta n=2 \cdot 10^{-4}-6 \cdot 10^{-4}$ на каждый градус. При повышении температуры величина показателя преломления уменьшается. Для разбавленных водных растворов характерны $\Delta n=1 \cdot 10^{-4}$ град⁻¹. Влияние давления составляет примерно $5 \cdot 10^{-5}$ единиц показателя преломления на 0.1 МПа. Насыщение жидкостей газами дает $\Delta n=10^{-5}-10^{-4}$ по сравнению с дегазированными средами [12].

Влияние температуры и давления на показатель преломления определяется двумя факторами: 1) изменением числа частиц в единице объема при нагревании или сжатии (т.е. коэффициентами расширения или сжимаемости); 2) зависимостью поляризуемости молекул от температуры и давления.

В отличие от таких оптических свойств, как поглощение веществ в той или иной области спектра, зависимость между изменением показателя преломления и концентрацией вещества в растворе в малой степени определяется химическим строением растворенного сорбата, что делает принцип рефрактометрического определения универсальным, но не слишком чувствительным. Рефрактометр реагирует на весь поток в целом, регистрируя суммарный показатель преломления в измерительной ячейке относительно показате-

ля преломления чистой подвижной фазы в ячейке сравнения. Чувствительность детектирования может быть повышена за счет правильного выбора подвижной фазы, а именно – при использовании элюента с очень высоким или очень низким показателем преломления. Хроматограмма при этом может иметь пики, обращенные в разные стороны от нулевой линии. При хроматографии высокомолекулярных полимеров часто используют рефрактометрический детектор, чувствительность которого не зависит от молекулярной массы полимера, так как эффективные радиусы растворенных свернувшихся в сфероидные формы макромолекул близки.

По данным каталогов фирм-производителей хроматографического оборудования [281-286] и литературы [13-57] составлена табл. 4.12, в которой представлены аналиты, при хроматографии которых целесообразно применение рефрактометрического детектора.

Таблица 4.12. Типовые сорбаты, анализируемые при помощи рефрактометрического детектора

Сорбаты	Подвижная фаза
Адапромин	Ацетонитрил - додецилсульфонат натрия, (0.01M) – уксусная кислота (30:70:2.5)
Амины, диамины, капролактамы	Бутиламин
Декстаны, полисахариды	Диметилсульфоксид
Гидроксикислоты	Серная кислота, 0.005-0.009 н
Высшие жирные кислоты	Ацетонитрил – ТГФ – вода (45:20:25)
Камфара	Гептан
Клиндамицин	Метанол – буферный раствор
Лецитины	Метанол – вода – хлороформ (100:10:1)
Линкомицин	Метанол – буферный раствор
Липиды, воски, эфирные масла	Метанол – вода (9:1), ацетонитрил – вода (2:1)
Ментол	Гептан – пропан-2-ол (99:1)
Моно-, ди-, трисахариды	Ацетонитрил – вода (85:15)
Метиловые эфиры жирных кислот	Метанол
Оксокислоты	Серная кислота, 0.005-0.009 н
Олигосахариды	Вода

Сорбаты	Подвижная фаза
Одно-, многоатомные спирты	Серная кислота, 0.005-0.009 н.
Органические кислоты	Серная кислота, 0.02-0.01 н.
	Трифторэтанол,
Полиамиды, нейлон	гексафторизопропанол – трифторацетат натрия (0.01 н.)
Поливинилпиридины	Бутиламин
Полиолефины, высшие алканы	1,2,4-трихлорбензол
Поливинилхлориды, ароматические полиэферы, эпоксидные смолы	Тетрагидрофуран
Полистиролы	Хлороформ
Производные целлюлозы	Диметилформамид
Простагландины	Ацетонитрил – фосфорная кислота (0.2%), 65:35
Полиэтиленгликоли	Диметилсульфоксид
Ремантадин	Ацетонитрил - додецилсульфонат натрия, 0.0125М (36:64)
Силиконы	Хлороформ
Триглицериды	Ацетонитрил – ацетон (2:1)
Фосфономидин	Вода
Фторированные эластомеры	Диметилацетамид
Холестерин	Хлороформ
Эластомеры, каучуки	Толуол

4.5. Флуоресцентные свойства

Флуоресценция – разновидность люминесценции, свечение вещества, возникающее после поглощения им энергии возбуждения и мгновенно ($\sim 10^{-9}$ с) затухающее после прекращения возбуждения. Флуоресценция наблюдается в УФ и видимой областях спектра. Спектр возбуждения – это функция распределения излучаемой веществом энергии в зависимости от длины (или частоты) возбуждения. В принципе форма спектра возбуждения должна быть идентична форме спектра поглощения молекул и не зависеть от длины волны, на которой измеряют флуоресценцию. Однако это выполняется очень редко. Дело в том, что спектры поглощения и возбуждения могут отличаться из-за различия химических и физи-

ческих свойств молекул в возбужденном состоянии по сравнению с основным. Например, молекулы в возбужденном состоянии характеризуются иной геометрией и иными межатомными расстояниями, а значит, и другими дипольными моментами.

Флуоресценция сорбата в ячейке флуориметрического детектора возникает за счет поглощаемой энергии возбуждающего света. Однако лишь часть ее превращается в энергию флуоресценции. Эффективность этого процесса можно охарактеризовать *квантовым выходом люминесценции* – отношением числа испущенных квантов люминесценции N_{λ} к числу поглощенных квантов возбуждающего света N_n .

$$B_{\kappa\lambda} = N_{\lambda} / N_n \quad (4.4)$$

Часть энергии возбуждения всегда расходуется на развитие безызлучательных переходов, поэтому $B_{\kappa\lambda} < 1$. Чем выше величина квантового выхода люминесценции, тем эффективнее флуоресцентные свойства вещества. У нелюминесцирующих молекул квантовый выход либо равен, либо близок к нулю. Вещества, способные к флуоресценции (люминофоры), обладают определенными особенностями химического строения. К ним относятся полициклические ароматические углеводороды и многие азот- и кислородсодержащие гетероциклические соединения. По мере увеличения степени сопряжения в люминофоре наблюдается длинноволновый сдвиг как спектра возбуждения, так и спектра флуоресценции. Одновременно с этим имеет место увеличение квантового выхода. В случае изомерных ароматических углеводородов с одинаковым числом ядер почти всегда спектры флуоресценции линейных полициклических систем смещены в сторону длинных волн по сравнению со спектрами аналогичных нелинейных систем. Так, длина волны в максимуме спектра флуоресценции антрацена равна 400 нм, а фенантрена – 350 нм; тетрацена – 480 нм, а бензантрацена – 380 нм.

Жесткая плоскостная конфигурация молекулы благоприятствует высокому квантовому выходу. Например, ксантеновый краситель родамин 6Ж, благодаря высокосопряженной планарной структуре, имеет квантовый выход, близкий к 1. При этом максимум флуоресценции у родамина 6Ж лежит в области 550-570 нм.

Таблица 4.13. Флуоресцентные свойства линейных полиядерных аренов

соединение	$B_{\text{кв}}$	λ возбуждения, нм	λ флуоресценции, нм
Нафталин	0.29	286	321
Антрацен	0.46	365	400
Тетрацен	0.60	390	480

При использовании флуоресценции для детекции сорбатов следует помнить, что флуоресцентные характеристики молекул зависят не только от их химического строения, но и от условий хроматографии (температура, pH, вязкость, природа растворителя). Примеси, содержащиеся в подвижной фазе, в первую очередь, растворенный кислород, способны вызвать гашение флуоресценции. Такое же действие оказывают кислородсодержащие растворители.

ПФ не должна поглощать свет ни на длине поглощения, ни на длине волны излучения. Рассеянный свет от источника возбуждающего излучения, который возникает из-за наличия в элюате крупных молекул или других рассеивающих излучение частиц, также способен исказить результаты измерения флуоресценции.

Таблица 4.14. Значения квантовых выходов флуоресценции $B_{\text{кв}}$ некоторых эталонных органических люминофоров

Соединение	Растворитель	$B_{\text{кв}}$
Родамин 6Ж	Этанол	0.94
Родамин 110	Этанол	0.91
Родамин С	Этанол	0.73
3-Аминофталимид	Этанол	0.62
Кумарин 120	Этанол	0.61
Оксазин 12	Этанол	0.58
Крезильовый фиолетовый	Этанол	0.56
Оксазин 1	Этанол	0.11
Эритрозин	Ацетонитрил	0.33
	Изобутанол	0.14
	Пропан-1-ол	0.09
	Этиленгликоль	0.06

Флуоресценцией обладает ограниченное число веществ, поэтому флуориметрический детектор имеет не только на 2 порядка более высокую, чем спектрофотометрический детектор, чувствительность, но и уникальную специфичность. В тех же случаях, когда анализируемые сорбаты не флуоресцируют, разработаны методики их химической модификации для получения флуоресцирующих производных [12,305-308].

При этом различные органические вещества после одинаковой химической обработки приобретают почти одинаковую флуоресценцию, что вполне удобно при количественном хроматографическом анализе методом внутренней нормализации, основанном на линейной и одинаковой для всех разделяемых флуоресцирующих компонентов зависимости интенсивности свечения от их концентрации. Например, флуорескамин и фталевый ангидрид – не флуоресцирующие реагенты, которые взаимодействуют с первичными аминогруппами в щелочной среде с образованием флуоресцирующих производных аминов, аминокислот. Производные фталевого альдегида отличаются большей интенсивностью, чем производные флуорескамина, кроме того, фталевый альдегид растворим в воде, что привлекательно для проведения модификации в водных средах. В табл. 4.15 – 4.16 приведены типовые сорбаты, анализируемые с использованием флуориметрического детектора.

Таблица 4.15. Соединения, обнаруживаемые флуориметром

Соединение	Модифицирующий агент	λ возб., нм	λ флуор., нм	Растворитель
Амино- кислоты	Флуорескамин	275	370	Цитратные буферные растворы, градиент
	Фталевый ангидрид	305-395	420-650	ТГФ – метанол – буферный раствор, градиент
	Дансилхлорид	340	510	Бензол – пиридин – CH ₃ COOH, градиент
	7-фтор-4- нитробензо-2-окса- 1,3-диазол	470	530	Фосфатный буфер – метанол - ТГФ, pH=6.0

Продолжение таблицы 4.15.

Соединение	Модифицирующий агент	λ возб., нм	λ флуор., нм	Растворитель
Аминосакхара	Флуорескамин	275	370	Цитратные буферные растворы, градиент
Биогенные алифатические амины	Флуорескамин	275	370	Цитратные буферные растворы, градиент
Беталаины	Нет	270	330	Метанол – вода, ацетонитрил - вода
Глифозаты	Нет	350	440	Метанол - фосфатный буфер
Катехоламины	Фталевый альдегид	355	418	Цитратные буферные растворы, градиент
Катехол-амины	Нет	200-220	310-330	Цитратные буферные растворы, градиент
Меркаптаны	4-аминосульфони-7-фтор-2,1,3-бензоксадиазол	380	510	Ацетонитрил - фосфатный буфер, градиент
Карбаматы	Фталевый альдегид	339	445	Ацетонитрил - метанол-вода, градиент
Пептидные гормоны, инсулин	Флуорескамин	275-280	370	Ацетонитрил – фосфатный буфер, градиент
Пептиды	Дансилхлорид	360	487	метанол – 0.01M сульфат натрия
Порфирины	Нет	305-395, 400-410	430-470, 600-630	Метанол – фосфатный буфер (pH=3.5)
Производные индола	Нет	270-280	350-360	Метанол – буферный раствор, градиент
Моно-, ди-, трисахариды	7-амино-1,3-нафталиндисуль-фокислота	255	450	0.1% триэтиламин, раствор уксусной кислоты, pH=3.5

Таблица 4.16. Лекарственные вещества, анализируемые при помощи флуориметрического детектора

Соединение	λ взб., нм	λ флр., нм	Растворитель
Адриамицин	480, 470	560-580, 585	Ацетонитрил – буферные растворы
Ализаприд	323	370	Метанол - буферный раствор
Алпренолол	225	320	Ацетонитрил – буферные растворы
Амилорид	286	370	Ацетонитрил – буферные растворы
Ампицилин	345	4200	Метанол – вода (3:2)
Анаприлин	200	310-330	Буферные растворы
Апоморфин	281	418	Метанол - буферные растворы
Атенолол	280	300	Ацетонитрил – буферные растворы
Ацебутолол	238	450	Буферные растворы
Бетаксолол	275, 285	305, 330	Ацетонитрил – буферные растворы,
Бопиндоллол	380	510	Метанол – буферные растворы
Буметанид	340	425	Метанол - буферные растворы
Буфуралол	250	300	Метанол – вода - уксусная кислота
Верапамил	280	314	Метанол - буферные растворы
Гентамицин	275, 365	418, 440	Метанол – ацетонитрил - буферные растворы
Гептаминол	338	445	Ацетонитрил – буферные растворы, метанол – буферные растворы
Глауцин	310	340	Ацетонитрил – буферные растворы, метанол – буферные растворы
Дезметилнапроксен	275	410	Гексан – метанол – ТГФ - диэтиламин (88.5:7.5:4:0.15)
Индометацин	305	370	метанол – буферные растворы
Карминомицин	470	550	Ацетонитрил – буферные растворы (pH=5)
Кетансерин	310	370	Ацетонитрил – буферные растворы (pH=4)
			Ацетонитрил – буферные растворы

Соединение	λ взб., нм	λ флр., нм	Растворитель
Лоназолак	282	389	Ацетонитрил – буферные растворы (pH=2.7)
Мелфалан	260	350	Метанол - вода (4:6)
Метолазон	230	420	Метанол - вода (1:1)
Метопролол	280	300	Метанол - буферные растворы
Набуметон	284	320	Метанол - буферные растворы (pH=3)
Пенбутолол	290	330	Ацетонитрил – буферные растворы (pH=2.85)
Пиндолол	220	360	Ацетонитрил – буферные растворы
Пирмендол	295	340	Ацетонитрил – метанол - буферные растворы (pH=3.5)
Преналтерол	220	360	Ацетонитрил – буферные растворы
Ретинол	325	480	Гексан – этанол (99:1)
Рубомицин	480	560	Ацетонитрил – буферные растворы (pH=4)
Теразосин	250	370	Ацетонитрил – тетрагидрофуран - буферные растворы (pH=2.7)
Тиабензалол	305	370	метанол – буферные растворы (pH=7)
Тиогуанин	330	389	метанол – буферные растворы
Токаиридид	395	485	метанол – буферные растворы (pH=7)
Токоферол	295	390	Гексан – этанол (99:1)
Триамтерен	286	370	Ацетонитрил – буферные растворы (pH=2.2)
Флеканид	300	370	метанол – буферные растворы
Фостедил	290	370	Ацетонитрил – вода (3:2)
Фуросемид	275,	410,	Ацетонитрил – буферные растворы,
	233	389	Метанол – буферные растворы (pH = 2-3)
Хинидин	340	418	Ацетонитрил – буферные растворы, градиент

Соединение	λ взб., нм	λ флр., нм	Растворитель
Хинин	350	450	Ацетонитрил – метанол - буферные растворы
Хлорбутин	285	320	Метанол - буферные растворы
Цефалексин	345	420	Метанол - вода (3:2)
Циталопам	240	300	Ацетонитрил – буферные растворы

4.6. Электрохимические свойства

Электрохимическое детектирование базируется на электрохимических свойствах соединений в потоке элюента. Кондуктометрические детекторы реагируют на изменения параметров элюата, амперометрические и кулонометрические – на отдельные компоненты элюата (сорбаты).

Большинство электрохимических детекторов работают в амперометрическом режиме, при котором поддерживается постоянное напряжение между двумя электродами, погруженными в поток элюента, и регистрируется зависимость силы тока от времени. Они работают только с проводящей водной подвижной фазой. Поэтому сорбаты должны растворяться в таких подвижных фазах и обладать электрофорными функциональными группами способными легко восстанавливаться или окисляться.

Таблица 4.17. Типовые смеси ионов, анализируемые при помощи кондуктометрического детектора

Смеси разделяемых ионов	Типовой растворитель
Анионы бромид, фторид, хлорид, нитрит, нитрат, фосфат, сульфат	1.02 мМ гидрокарбоната натрия и 1.08 мМ карбоната натрия в воде
Анионы иодид, тиокарбонат, тиосульфат	1.4 мМ гидрокарбоната натрия и 1.1 мМ карбоната натрия в 0.4 мМ пара-цианофенола в воде
Анионы силикат, борат и цианид	5 мМ гидроксида натрия в воде
Анионы ацетат и трифторацетат	2.8 мМ гидрокарбоната натрия и 2.2 мМ карбоната натрия в 0.1 мМ пара-цианофенола в воде

Смеси разделяемых ионов	Типовой растворитель
Анионы ацетат, лактат, формиат, фторид, хлорид	5 мМ тетрабората натрия
Анионы бромид, нитрат, нитрит, сульфат, фторид, хлорид	2мМ фталевой кислоты, pH=4.5 в воде
Анионы цитрат, фосфат, хлорид	2мМ фталевой кислоты, 8 мМ бензойной кислоты в воде
Анионы алкилсульфатов	0.02 г/л ацетата аммония в 40% метаноле
Анионы сахараина и лимонной кислоты	3 мМ карбоната натрия, 4 мМ гидроксида натрия
Анионы уксусной, щавелевой, малеиновой, муравьиной, яблочной, янтарной кислот	1 мМ серной кислоты
Катионы натрия, калия, магния, кальция	7 мМ лимонной кислоты в воде
Катионы аммония, лития, натрия, калия, никеля, цинка, кобальта, кальция, магния	2мМ винной кислоты, 1 мМ щавелевой кислоты

В ячейке детектора создается такая разность потенциалов, при которой достигается предельный ток для данного класса анализируемых соединений. В амперометрических детекторах электрохимические превращения испытывают 1-10% сорбата, в кулонометрических – до 100%. Большинство неорганических ионов могут быть электрохимически окислены или восстановлены. Среди органических соединений электрофорными свойствами обладают ароматические амины, аскорбиновая кислота, ацетилхолины, гидроксииндолы, имины, катехины, меркаптаны, моносахариды, мочевиная кислота, металлоорганические соединения, нитропроизводные, нитрозопроизводные, пурины, сульфиды, семикарбазиды, фенолы, фенотиазины, хиноны. Эти соединения могут быть обнаружены при хроматографическом разделении электрохимическими детекторами.

Вещества, содержащие фенольную, индольную или альдегидную группы, способны окисляться при низких потенциалах (0.4-0.7 В), а вещества с нитро- или кетогруппами – восстанавливаться. Катехоламины и 5-гидроксииндолы в этих условиях способны окис-

Таблица 4.18. Примеры сорбатов, анализируемых при помощи электрохимических детекторов

Соединение	Растворитель
Антазолин	0.01 М перхлората аммония – 0.0001 М гидроксида натрия – метанол
Алимемазин	0.1 М ацетата аммония – ацетонитрил (1:9)
Аллилпродин	0.01 М перхлората аммония – 0.0001 М гидроксида натрия – метанол
Аминазин	0.02 М дигидрофосфата калия – ацетонитрил (55:45)
Ацепромазин	0.01 М перхлората аммония – 0.0001 М гидроксида натрия – метанол
Ацетофеназин	0.02 М дигидрофосфата калия – ацетонитрил (55:45)
Бензтропин	0.01 М дигидрофосфата калия (pH=7) – ацетонитрил – метанол (40:48:12)
Бетамепродин, бетаметадол, бетацилметадол	0.01 М перхлората аммония – 0.0001 М гидроксида натрия – метанол
Бромфенирамин	0.01 М перхлората аммония – 0.0001 М гидроксида натрия – метанол
Бруцин	0.01М тетраметиламмония гидроксид - лимонная кислота (pH=6) – ацетонитрил (25:75)
Буфотенин	0.01 М перхлората аммония – 0.0001 М гидроксида натрия - метанол
Верапамил	0.01 М перхлората аммония – 0.0001 М гидроксида натрия - метанол
Галоперидол	0.2 М ацетата аммония – ацетонитрил (10:90)
5-гидроксииндолы	0.1 М цитратно-фосфатный буферный раствор с 12% метанола и 0.5 мМ октилсульфата, pH=4.6
Дамилен	0.01 М перхлората аммония – 0.0001 М гидроксида натрия - метанол
Дезипрамин	0.2 М ацетата аммония – ацетонитрил (10:90)
Дигидрокодеин, дигидроморфин	0.01М тетраметиламмония гидроксид - лимонная кислота (pH=6) – ацетонитрил (25:75)
Димедрол, дикаин, диметотиазин, динезин	0.01 М перхлората аммония – 0.0001 М гидроксида натрия - метанол
Изометадон	0.01 М перхлората аммония – 0.0001 М гидроксида натрия - метанол
Имизин	0.02 М дигидрофосфата калия – ацетонитрил (55:45)

Соединение	Растворитель
Импиндол	0.01 М перхлората аммония – 0.0001 М гидроксида натрия - метанол
Клоназепам	0.02 М дигидрофосфата калия – ацетонитрил (55:45)
Кокаин	0.01 М перхлората аммония – 0.0001 М гидроксида натрия - метанол
Катехоламины	Ацетонитрил – фосфатный буфер (pH=2.8), 18:82
Левомепразин	0.02 М дигидрофосфата калия – ацетонитрил (55:45)
Морфередин, морфин	0.01 М перхлората аммония – 0.0001 М гидроксида натрия - метанол
Новокаин, новокаиномид, проксиметакаин	0.01 М перхлората аммония – 0.0001 М гидроксида натрия - метанол
Олигосахариды*	0.1М гидроксида натрия, 0.2М ацетата натрия в воде
Парацетамол	0.02 М дигидрофосфата калия – ацетонитрил (55:45)
Пеницилламин	Метанол – фосфатный буфер
Полиолы и моносахариды*	0.1М гидроксид натрия в воде
Прогабид	Метанол – фосфатный буфер
Проназин, прохлорперазин	0.02 М дигидрофосфата калия – ацетонитрил (55:45)
Салбуматол	Метанол – фосфатный буфер
Спазмолитин	0.01 М перхлората аммония – 0.0001 М гидроксида натрия - метанол
Тербуталин	Ацетонитрил – цитратный буфер (pH=6)
Тиамин	0.01 М перхлората аммония – 0.0001 М гидроксида натрия - метанол
Тиоридазин	0.02 М дигидрофосфата калия – ацетонитрил (55:45)
Толазолин, толпропамин, тофенадин	0.01 М перхлората аммония – 0.0001 М гидроксида натрия - метанол
Тиметоприм	Метанол – фосфатный буфер (pH=3,75), (1:3)
Тригексилфендил	0.2М ацетата аммония – ацетонитрил (pH=6.99), (10:90)
Трифлупромазин, трифлуперазин	0.2М ацетата аммония – ацетонитрил (pH=6.99), (10:90)
Фенетазин, фенметразин, фенирамин	0.01 М перхлората аммония – 0.0001 М гидроксида натрия - метанол

Соединение	Растворитель
Фенотиазин, фторфеназин	0.02 М дигидрофосфата калия – ацетонитрил (55:45)
Хинин	0.01 М перхлората аммония – 0.0001 М гидроксида натрия - метанол
Хлоропирилен, хлорпротиксен, хлорфенирамин,	0.01 М перхлората аммония – 0.0001 М гидроксида натрия - метанол
Цинхокаин	0.01 М перхлората аммония – 0.0001 М гидроксида натрия - метанол
Цисплатин	Цитратный буфер (pH=7.3)
Этаперазин	0.02 М дигидрофосфата калия – ацетонитрил (55:45)
Эстрогены	Ацетонитрил – фосфатный буфер – хлорид лития (pH=3.1)
Эфедрин	0.01М тетраметиламмония гидроксид - лимонная кислота (pH=6) – ацетонитрил (25:75)

* Импульсный амперометрический детектор

ляться, отдавая два электрона. Так, для 5-гидроксииндолов нужен потенциал 0.5-0.55 В, для катехоламинов – 0.5-0.7В, для пептидов – 0.9-1.2 В. В целом в водных растворах потенциалы, при которых осуществляются электрохимические превращения могут быть от +1,2 до –2.0 В (электрод сравнения – хлорсеребряный) [12,13,51,57].

Электрохимические свойства сорбатов нашли широкое применение в контроле качества пищевых продуктов, фармацевтических препаратов с использованием электрохимических детекторов. Амперометрический метод детектирования в 10 раз чувствительнее рефрактометрического, он отличается высокой селективностью [340,343].

В связи с тем, что принцип обнаружения требует наличия проводящих жидкостей, чистая вода не пригодна в качестве подвижной фазы. Поэтому используют сильно разбавленные буферные растворы (фосфатные, боратные, цитратные и т.д.). Для уменьшения фоновых шумов фосфаты и другие реактивы для создания буферных растворов необходимо перекристаллизовывать, использовать высокочистую воду и растворители марки “осч” или для ВЭЖХ.

ГЛАВА 5. СВОЙСТВА КОМПОНЕНТОВ ПОДВИЖНЫХ ФАЗ

Оптимизация состава подвижной фазы наиболее продуктивный и экономичный способ повышения качества хроматографической методики. Достаточно иметь полтора-два десятка растворителей, чтобы на 3-5 колонках разного типа, рекомендованных в литературе для решения хроматографической задачи, найти приемлемое разделение аналитов. Роль подвижной фазы (растворителя) в жидкостной хроматографии многообразна. Наряду с чисто транспортной функцией (перемещение концентрационной зоны сорбата по колонке), растворитель активно участвует в самом процессе разделения и оказывает существенное влияние на возможности детектирования. Часто незначительное изменение состава подвижной фазы дает возможность оптимизировать процесс, улучшить форму пиков, разрешение отдельных компонентов и даже изменить механизм разделения. Замена одного растворителя другим может изменить фактор удерживания в 10^3 - 10^5 раз. Поэтому при выборе растворителей необходимо учитывать весь комплекс их свойств, в той или иной степени влияющих на проведение хроматографического эксперимента.

Интенсивное развитие жидкостной хроматографии и химии растворов за последние десятилетия позволило выдвинуть и обосновать многообразные теоретические и эмпирические аспекты участия растворителя в хроматографических процессах. Полученные обобщения позволяют предложить основанные на фундаментальных положениях хроматографии и физической химии, в частности, термодинамики растворов методы управления сорбционными и хроматографическими процессами. Становление теории относится к необходимому, но еще недостаточным условиям внедрения ее разработок в практику. Важную роль играет экспериментальное накопление базы данных, статистическая, хемометрическая оценка полученных результатов. До сих пор подбор оптимальных условий разделения разноплановых по химическому строению смесей органических соединений методами жидкостной хроматографии специалисты относят к области изящного искусства с элементами творческой интуиции. При этом их главным и обязательным инструментом является растворитель. Как

говорил Герман Бургава в своем трактате "Начала химии" (1732), "Химики предпочитают всем другим средствам растворитель и горделиво утверждают, что при его содействии могут совершать все чудеса своего искусства". Данное утверждение справедливо, как никакое другое в жидкостной хроматографии, так как подвижная фаза является компонентом хроматографической системы, который наиболее просто варьируется оператором при оптимизации разделения и детектирования. Возможности тонкой настройки параметров удерживания заметно расширяются, когда применяют не индивидуальные, а двух-, трех-, многокомпонентные растворители и растворы. Современная аппаратура позволяет не только заменять состав подвижной фазы, но и создавать градиент состава, а также градиенты температуры и давления во время проведения хроматографического разделения.

При подборе растворителей необходимо оценить совокупность их физических и химических свойств, как они совмещаются с выбранным методом разделения и как влияют на хроматографический процесс. Применение новых теоретических разработок и экспертных обобщений в части хроматографических свойств растворителей позволяет существенно сократить затраты времени и материалов на оптимизацию методик разделения и анализа веществ при помощи хроматографии. При этом важно знание свойств как исходных растворителей, применяемых в подвижных фазах, так и закономерностей их изменения в зависимости от состава смешанного растворителя, а также влияния на свойства растворителя температуры и давления.

Жидкостной хроматограф представляет собой комплекс механических, оптических, электрических и химических узлов, эффективная и надежная работа которых во многом зависит от свойств и качества используемых растворителей. Остановимся на важнейших требованиях, которые предъявляются к растворителям в жидкостной хроматографии. Отметим, что различные хроматографические методы, скажем, ВЭЖХ и ТСХ, аналитическая и препаративная ЖХ могут по ряду требований к элюенту резко отличаться. Различные запросы возникают к растворителям при использовании разных методов детектирования. Вместе с тем можно обобщить ряд основных и специфических требований к свойствам растворителей, пригодных в качестве компонентов подвижной фазы.

Так, растворители, применяемые в ВЭЖХ, должны удовлетворять следующим основным запросам: чистота, химическая инертность, совместимость с детектором, достаточная растворяющая способность по отношению к анализируемым веществам, низкая вязкость, безопасность, доступность. В некоторых случаях существенное значение имеют смешиваемость с другими растворителями, температура кипения и возможность легкого извлечения вещества из элюата [367].

5.1. Хроматографические свойства индивидуальных растворителей

Чистота растворителя в жидкостной хроматографии имеет очень большое значение, так как различные примеси в подвижной фазе влияют на все основные стадии процесса: подачу растворителя, разделение в колонке, детектирование и воспроизводимость результатов. Требуемая степень чистоты растворителя определяется выбранным вариантом разделения и используемой аппаратурой. Наличие примесей в растворителе может вызвать следующие типичные проблемы [57]:

1. Ухудшение эффективности разделения и воспроизводимости результатов (например, неконтролируемая влажность растворителя в адсорбционной хроматографии).
2. Сильное отклонение нулевой линии и образование ложных пиков при градиентном элюировании.
3. Ухудшение возможностей детектирования (например, при наличии примесей алкенов в насыщенных углеводородах при УФ-детектировании, примеси этанола в хлороформе при ИК-детектировании, или присутствие флуоресцирующих примесей или примесей, вызывающих гашение флуоресценции при детектировании флуориметром).
4. Порча сорбента (примеси оснований приводят к растворению силикагеля; примеси диенов и других лабильных соединений осмолются и блокируют поверхность адсорбентов, особенно оксида алюминия; примеси карбонильных соединений реагируют с привитыми сорбентами, содержащими аминогруппу; пероксиды окисляют привитые фазы и полистирольные гели).

5. Загрязнение веществ, выделяемых из элюата. В препаративной хроматографии приходится выделять вещества из очень разбавленных растворов. При этом даже незначительные примеси или добавки, которые не мешают аналитическому разделению, могут концентрироваться в извлекаемом веществе, существенно снижая его чистоту.

6. Разложение или химическое изменение компонентов пробы (типичные примеры – гидролиз металлоорганических соединений, окисление лабильных веществ пероксидами или растворенным кислородом).

7. Коррозия аппаратуры (пример – примесь HCl в хлорсодержащих растворителях).

8. Механическое загрязнение фильтров колонок взвешенными частицами приводит к нежелательному росту рабочего давления.

Не менее важна *химическая инертность*. Растворитель не должен реагировать ни с сорбатом, ни с сорбентом. Все, что сказано выше о химически активных примесях, имеет гораздо большее значение применительно к химической активности самих растворителей. Подчеркнем, что такие классы соединений, как кетоны, алифатические и ароматические амины, следует применять с особой осторожностью и только в тех случаях, когда их трудно заменить более стабильными растворителями. Такие элюенты, как галогеналканы, ТГФ, диоксан и другие простые эфиры, следует использовать только свежеочищенными.

Совместимость с детектором предполагает, что растворитель не мешает определению аналита с помощью выбранного детектора. Наиболее распространенными детекторами в настоящее время являются УФ-детекторы и дифференциальные рефрактометры. Возможность использования тех или иных растворителей в сочетании с УФ-детектором принято определять минимальной длиной волны, на которой при оптическом пути 10 мм падение интенсивности светового потока составляет 90%. Граничные длины волн, относящиеся к растворителям очень высокой степени очистки, приведены в табл. 5.2. Рассмотрение этих данных показывает, что с одноволновым УФ-детектором (254 нм) практически не могут быть использованы такие растворители, как бензол, толуол, тетрахлорметан,

ДМФА и хлороформ, а также сложные эфиры и кетоны. С рефрактометрическим детектором в принципе можно применять любые растворители, но его чувствительность определяется разностью показателей преломления растворителя и аналита. Поэтому при выборе растворителя следует учитывать его показатель преломления.

Вязкость растворителя должна быть, по возможности низкой, так как ее повышение ведет к ухудшению массопередачи, а тем самым и эффективности разделения, а также затрудняет работу насосов. При прочих равных условиях следует выбирать растворители, имеющие вязкость 0.5-0.7 мПа·с при температуре разделения.

Безопасность работы с теми или иными растворителями определяется их воспламеняемостью и токсичностью. Практически все растворители, применяемые в ВЭЖХ, имеют либо весьма низкую температуру вспышки, либо в определенной степени токсичны. Исключение составляет только вода. Поэтому помещение, в котором проводят работы по жидкостной хроматографии, должно иметь эффективную приточно-вытяжную вентиляцию. На рабочем месте недопустимы плохо продуваемые и застойные зоны, так как в них могут накапливаться пары растворителей, имеющие большую плотность, чем воздух. Нижний предел взрываемости многих растворителей составляет 1-2%, поэтому в застойных зонах возможно образование взрывоопасной смеси. Во всех случаях следует выбирать наименее пожароопасные и токсичные растворители, руководствуясь соответствующими данными, приведенными в табл. 2.3. Так, диэтиловый эфир можно заменить диизопропиловым, а бензол-толуолом практически без ущерба для разделения. С нашей точки зрения, токсичность является более важным фактором, чем пожароопасность. При хорошей организации рабочего места и тщательном соблюдении правил техники безопасности опасность загорания практически исключена, а контакта с растворителем полностью избежать невозможно. Многие ароматические и хлорсодержащие растворители обладают способностью накапливаться в организме человека. Следует отметить, что ПДК необходимо рассматривать с учетом температуры кипения растворителя: хотя метилхлорид и хлорбензол имеют одинаковую ПДК (50 мг/м³), но при прочих равных условиях в случае низкокипящего метилхлорида эта величина достигается значительно легче, чем для хлорбензола.

Температура кипения имеет значение при учете двух аспектов: обеспечении надежности работы насосов и детекторов и легкости выделения вещества из элюата. Низкокипящие растворители часто образуют пузырьки в насосах и детекторах. При использовании наиболее распространенных в настоящее время плунжерных насосов вероятность образования пузырьков тем больше, чем выше давление паров растворителя и скорость плунжера в фазе всасывания. Наличие пузырьков в насосе резко снижает точность подачи растворителя, а пузырьки в детекторе вызывают сильный шум и нестабильность нулевой линии. Для предотвращения этого явления проще всего применять растворители, температура кипения которых по крайней мере на 20-50 °С выше комнатной. С другой стороны, при необходимости препаративного выделения вещества целесообразно использовать высококипящие растворители.

Смешиваемость с другими растворителями необходимо учитывать при работе в режиме градиентного элюирования и при подготовке анализируемого образца с использованием предварительного экстракционного разделения. Следует помнить, что ПФ в ВЭЖХ всегда должна быть гомогенной. Однако такие важные полярные растворители, как метанол и ацетонитрил, ограниченно смешиваются с гексаном. Для расширения диапазона концентраций, соответствующих гомогенным смесям, гексан заменяют на циклогексан или изооктан. Полная смешиваемость в подобных системах достигается заменой полярного компонента на этанол или 2-пропанол.

Элюирующая сила растворителя – относительная способность вытеснять данный компонент образца из неподвижной фазы, вступать в такие межмолекулярные взаимодействия с компонентами хроматографической системы, которые способствуют десорбции компонента, более быстрому перемещению его концентрационной зоны по колонке. Взаимодействие растворителя с растворенным веществом определяется комплексом четырех основных типов межмолекулярных взаимодействий: дисперсионного, индукционного, донорно-акцепторного (включая образование водородной связи) и диэлектрического (сольватация ионов). Суммарный эффект всех типов взаимодействий определяет полярность растворителя, а преимущественное проявление какого-либо из них – его селективность.

Полярность растворителя в свою очередь определяет его элюирующую силу. В адсорбционной и нормально-фазовой распределительной хроматографии с увеличением полярности элюирующая сила растворителя возрастает, а в ОФХ – снижается. Чем больше элюирующая сила ПФ, тем меньше фактор удерживания для данного вещества на данном сорбенте. Элюирующая сила ПФ должна быть достаточно большой, чтобы время анализа не превышало оптимального для данного варианта хроматографии и, в то же время желательно, чтобы большая элюирующая сила не приводила к потере селективности разделения.

5.2. Основные физические и эксплуатационные свойства

Основные требования к растворителям для ВЭЖХ систематизированы в табл. 5.1. В табл. 5.2. приведены ключевые физические параметры наиболее часто применяющихся в жидкостной хроматографии растворителей – температура кипения, плотность, вязкость, показатель преломления, предел прозрачности в УФ-области спектра, растворимость растворителя в воде и воды в растворителе. Предел прозрачности взят для растворителей марки “для ВЭЖХ” или “для спектроскопии”. Этот предел определяется по длине волны, при которой оптическая плотность приближается к 1, или по пропусканию $T \geq 10\%$ в кюветах с толщиной слоя 1 см, по сравнению с водой.

Таблица 5.1. Основные требования к растворителям для ВЭЖХ [367]

Параметр	Требования	Факторы
Температура кипения	Достаточно высокая	Для предотвращения: образования паровых пузырей, мешающих работе клапанов и детекторов; изменения состава ПФ из-за испарения низкокипящего компонента
Плотность	Достаточно высокая	Более плотные ПФ требуют меньшей высоты напора над входом в насос, для них менее вероятен турбулентный тип потока

продолжение таблицы 5.1.

Параметр	Требования	Факторы
Вязкость	Минимальная	В низковязких ПФ эффективней диффузия, массообмен, меньше рабочее давление насоса
Поглощение в УФ области	Минимальное	Малая прозрачность ПФ ухудшает чувствительность спектрофотометрического детектора
Химическая стабильность	Максимальная	Чтобы не использовать стабилизаторы, для избежания дрейфа времен удерживания
Химическая инертность	Максимальная	Для предотвращения модификации сорбентов и сорбатов
Чистота	Отсутствие летучих и нелетучих примесей	Для предотвращения помех в работе детектора и колонок
Стоимость	Невысокая	Для снижения расходов на анализ
Совместимость с разбавителем	Максимальная	Для избежания расслоения ПФ и помех при детектировании
Растворимость сорбатов	Достаточно высокая	Для предотвращения помех в работе колонок и детектора
Элюирующая сила	Достаточно большая	Для сокращения времени анализа
Токсичность	Минимальная	Для безопасности работ
Воспламеняемость	Достаточно низкая	Для безопасности при хранении и использовании

Сведения приведены для давления 101.32 кПа (760 мм рт. ст.). В табл. 5.3 представлены эксплуатационные характеристики индивидуальных растворителей – стоимость в условных единицах, токсичность, выраженная в значении предельно допустимой концентрации в воздухе рабочей зоны, принятые или рекомендованные в России и пожароопасные свойства (температура вспышки в закрытом тигле, температура самовоспламенения и концентрационные пределы воспламенения, об. %).

Таблица 5.2. Физические свойства растворителей [367]

Растворители	Т _{кип} , °C	с при 25 °C, г/см ³	n _D ²⁵	η·10 ³ , (Па·с) при 25 °C	Предел УФ, нм	Растворимость (%) при 20 °C	
						в воде	воды
Анизол	153.7	0.9893	1.5143	0.895		0.15 [#]	
Анилин	184.4	1.0175	1.5832	3.77	325	3.4	5 [#]
Ацетон	56.24	0.7845	1.3560	0.304	330	∞	∞
Ацетонитрил	81.6	0.7767	1.3416	0.341	195	∞	∞
Бензальдегид	179	1.0434	1.5428	1.395	390	0.33	
Бензиловый спирт	205.5	1.0413	1.5384	5.52	250	4 ⁽¹⁷⁾	
Бензол	80.1	0.8737	1.4979	0.603	280	0.18 [#]	0.05 [#]
Бензонитрил	191	1.0006	1.5259	1.213	300	0.3	0.03
Бромбензол	155.9	1.4882	1.5601	1.060		0.045 ⁽³⁰⁾	
Бромэтан	38	1.459 [*]	1.425 [*]	1.24	225	0.91	
Бромформ	146.6	2.892 [*]	1.598 [*]	1.89	330	0.32 ⁽³⁰⁾	
Бутан-2-он	79.6	0.7997	1.3761	0.383	330	27	12
Бутан-1-ол	117.7	0.8060	1.3973	2.593	215	7.8	20
Бутан-2-ол	99.6	0.8026	1.3950	3.66	220	12.5	20
Изобутанол	108	0.7978	1.4079	3.91	219	10	16.4
трет-Бутанол	82.4	0.7810	1.3939	5.12	215	∞	∞
Бутилацетат	126.1	0.8764	1.3873	0.672	256	1.0	1.4
Бутиронитрил	117.9	0.7865	1.3920	0.549		3.0	
2-Бутоксиэтанол	170.1	0.8964	1.4177	3.15	220	50	50
Вода	100	0.9971	1.3325	0.894	190		
Гексан	68.7	0.6548	1.3723	0.299	195	0.014	0.01
Гексан-1-ол	157.4	0.8159	1.4161	4.59	220	0.59	
Гептан	98.4	0.684 [*]	1.3876 [*]	0.3903	197	0.005	0.01
Глицерин	290	1.2582	1.4735	945	205	∞	∞
Декан	174.1	0.730 [*]	1.4120 [*]	0.92 [*]	210	0	0
Диизопропиловый эфир	68.3	0.7182	1.3655	0.379	220	0.9	0.6
ДМСО	189.0	1.0958	1.4773	1.996	270	∞	∞
ДМФА	153.0	0.9445	1.4269	0.796	270	∞	∞
1,2-диметоксиэтан	93.0	0.8621	1.3781	0.455	220	∞	∞
1,4-Диоксан	101.3	1.0268	1.4203	1.194	225	∞	∞
Дипропиловый эфир	89.6	0.7419	1.3780	0.399	220	0.25 [#]	
1,2-Дихлорбензол	180.5	1.3003	1.5491	1.26	295	0.0145	0.013
1,2-дихлорэтан	83.5	1.2458	1.4421	0.779	230	0.81	0.15
Диэтиламин	56	0.707 [*]	1.3870 [*]	0.38 [*]	275	∞	∞
Диэтиленгликоль	244.8	1.1127	1.4461	30.0	210	∞	∞

продолжение таблицы 5.2.

Растворители	Т _{кип} , °C	с при 25 °C, г/см ³	n _D ²⁵	η·10 ³ , (Па·с) при 25 °C	Предел УФ, нм	Растворимость (%) при 20 °C	
						в воде	воды
Диэтиловый эфир	34.6	0.7076	1.3495	0.238	218	7.0	1.5
Диэтилсульфид	92.1	0.8362 [*]	1.4430	0.45 [*]	290	0.313	
Изооктан	99.2	0.6919 [*]	1.3915 [*]	0.50 [*]	200	0.0002	0.006
Изопентанол	130.5	0.8701	1.4052	3.48	220	2.7	
мета-Крезол	202.8	1.0302	1.5376	15.0		2.4	
пара-Ксилол	138.4	0.8564	1.4933	0.605	294	0.198 [#]	
Кумол	152.4	0.8618 [*]	1.4915 [*]	0.739	290	0.01	
Мезитилен	164.7	0.8611	1.4968	1.039	290	0.002	
Метанол	64.5	0.7868	1.3265	0.5445	205	∞	∞
Метилацетат	56.3	0.9279	1.3614 [*]	0.364	260	30	8.0
Метилизобутилкетон	116.5	0.7961	1.3933	0.542	330	1.8	1.9
Метиленхлорид	40.1	1.3266 [*]	1.4242 [*]	0.44 [*]	235	2	0.2 [#]
2-метоксиэтанол	124.6	0.9602	1.4002	1.60	213	∞	∞
Муравьиная кислота	100.6	1.2141	1.3694	1.966	230	∞	∞
Нитробензол	210.8	1.1984	1.5500	1.795		0.19	0.24 ⁽³⁰⁾
Нитрометан	101.2	1.1313	1.3796	0.610	380	10	2.4
Октан-1-ол	195.2	0.8221	1.4275	7.36	215	0	0
Пентан	36.1	0.6214	1.3575 [*]	0.2152	195	0.036 ⁽¹⁶⁾	0.009
Пентан-1-ол	137.8	0.8115	1.4079	3.35	210	2.2	9.2
Петролейный эфир (40-60)	47.5	0.650-0.695	1.368-1.369	0.3	210		0.02
2-пикколиин	129.2	0.9443 [*]	1.4957	8.102 [*]	315	∞	∞
Пиперидин	106.5	0.8549	1.4534 [*]	1.34		∞	∞
Пиридин	115.3	0.9780	1.5075	0.884	315	∞	∞
Пропан-1-ол	97.5	0.7995	1.3835	2.0004	210	∞	∞
Пропан-2-ол	82.4	0.7810	1.3752	2.073	205	∞	∞
Пропионовая кислота	140.8	0.9880	1.3843	1.025	230	∞	∞
Сероуглерод	46.2	1.2555	1.6241	0.347	380	0.3	0.005
ТГФ	66.0	0.8842	1.4036	0.460	212	∞	∞
Тетрахлорметан	76.8	1.5844	1.4574	0.905	265	0.08 [#]	0.01 ⁽²⁴⁾
1,1,2,2-тетрахлорэтан	46.2	1.59 [*]	1.494 [*]	1.84 ⁽¹⁵⁾	230	0.288	
Тетрахлорэтилен	121.2	1.619 [*]	1.5055 [*]	0.88 [*]	290	0.015	0.010
Толуол	110.6	0.8623	1.4941	0.552	285	0.05	0.05

продолжение таблицы 5.2.

Растворители	$T_{кип}, ^\circ C$	ρ при 25 $^\circ C, г/см^3$	n_D^{25}	$\eta \cdot 10^3$, (Па·с) при 25 $^\circ C$	Пре- дел УФ, нм	Растворимость (%) при 20 $^\circ C$	
						в воде	воды
1,2,4-три- хлорбензол	213	1.454*	1.572*	0.5 ⁽¹³⁵⁾	310	0.0025	0.02
Трифторуксусная кислота	71.8	1.4785	1.2850*	0.855	210	∞	∞
1,2,2-трифтор- 1,1,2-трихлорэтан	47.63	1.5635	1.3557	0.711	231		
2,2,2-три- фторэтанол	73.8	1.3826	1.2907 ⁽²²⁾	1.651	∞	∞	
Трихлорэтилен	87	1.466*	1.4714*	0.58*		0.027	0.08
Триэтиламин	89.5	0.7230	1.4010*	0.363		1.5	
Уксусная кислота	117.9	1.0437	1.3698	1.124	230	∞	∞
Формамид	210.5	1.1292	1.4468	3.30	270	∞	∞
Хлорбензол	131.7	1.1009	1.5221	0.756	287	0.05	0.04
1-Хлорпентан	108	0.8737	1.413*	0.43	225		
Хлористый бензил	179.3	1.100	1.5391*		310		

Примечания. Цифры в скобках указывают температуру определения показателей ($^\circ C$) в тех случаях, когда она отличается от указанной в заголовках столбцов. Знак "*" означает, что параметр определен при 20 $^\circ C$, знак "#" указывает на растворимость при 25 $^\circ C$, а знак " ∞ " означает неограниченную растворимость.

Применение в планарной хроматографии систем растворителей с компонентами, обладающими слишком большим давлением паров, приводит к плохой воспроизводимости R_f .

Давление насыщенных паров необходимо учитывать при обеспечении мер по технике безопасности при выполнении хроматографических методик. При одинаковых ПДК в рабочей зоне предпочтителен растворитель с более низким давлением паров.

Подробную информацию о хроматографических свойствах растворителей можно найти в литературе [78,339,367]. Садек в своей монографии [339] не только обобщил свойства растворителей, используемых в ВЭЖХ, но и систематизировал именно по растворителям-модификаторам условия ВЭЖХ разных аналитов.

Таблица 5.3. Техничко-эксплуатационные свойства растворителей

Растворители	ПДК, мг/м ³	$T_{вс}, ^\circ C$	$T_{свп}, ^\circ C$	Концентрацион- ные пределы воспламенения, об. %	
				нижний	верхний
Анизол		41	485	0.34	6.3
Анилин	0.1	70	770	1.3	
Ацетон	200	-18	538	2.6	12.8
Ацетонитрил	10	6	>450	4	16
Бензальдегид	5	64	250		
Бензиловый спирт		90	400	1.5	15.5
Бензол	75	-11	562	1.3	7.1
Бензонитрил	1				
Бромбензол	3	30	545		
Бромэтан	5	-25	455	6.0	11.0
Бромформ	5	нет			
Бутан-2-он	200	-7		1.8	11.5
Бутан-1-ол	10	29	363	1.4	11.2
Бутан-2-ол	150	24		1.9	7.9
Изобутанол	10	28	390		
трет-Бутанол	100	9	480	1.8	8.0
Бутилацетат	200	25	370	1.35	8.35
Бутиронитрил		21			
2-бутоксизтанол					
Вода		нет			
Гексан	300	-21.6	261	1.1	7.5
Гексан-1-ол	10	62	310		
Гептан	300	-4	223	1.1	6.0
Глицерин	300	174	393	2.6	11.3
Декан	300	47	208	0.6	5.5
Диизопропи- ловый эфир	250	-28	443	1.4	21
Диметилсуль- фоксид	20	95	215		
Диметил- формамид	10	58	420	2.2	15.2
1,2-диметокси- этан		<21			

продолжение таблицы 5.3.

Растворители	ПДК, мг/м ³	T _{вс} , °C	T _{свп} , °C	Концентрационные пределы воспламенения, об. %	
				нижний	верхний
1,4-Диоксан	10	5	300	2.0	22.5
Дипропиловый эфир		-16	240		
о-Дихлорбензол	10	66		2.2	9.2
1,2-Дихлорэтан	10	13	413	6.2	16.9
Диэтиламин	30	-26	310	1.8	10.1
Диэтиленгликоль	0.2	135	345		
Диэтиловый эфир	300	-41	164	1.8	48.0
Диэтилсульфид	300	-10			
Изооктан	300	-9	430	0.95	6.0
Изопентанол	0.01	43	340	1.2	9.0
мета-Крезол	0.5	94	558	1.1 ⁽¹⁵⁰⁾	
пара-Ксилол	50	27	528	1.1	7.0
Кумол	50	34	500	0.88	6.5
Мезитилен	120			0.37	11.6
Метиленхлорид	50	-14	580	12.1	22.0
Метанол	5	11	464	7.3	36
Метилацетат	100	-9	470	3.1	16
Метилизобутилкетон		18			
2-Метоксиэтанол		46.1	288		
Муравьиная кислота	1	60	504	14.3	33.3
Нитробензол	3	87	482	1.8 ⁽⁹³⁾	
Нитрометан	30	44.4		7.3	
Октан-1-ол	10	64			
Пентан	300	-40	285	1.4	8.0
Пентан-1-ол	10	49	300	1.2	10
Петролейный эфир	300	от -58 до -18	280-320		
2-пиколин	5				

продолжение таблицы 5.3.

Растворители	ПДК, мг/м ³	T _{вс} , °C	T _{свп} , °C	Концентрационные пределы воспламенения, об. %	
				нижний	верхний
Пиперидин	0.2	16			
Пиридин	5	23.3		1.8	12.4
Пропан-1-ол	5	23.0	371	2.1	13.5
Пропан-2-ол	980	11.7	400	2.23	12.7
Пропановая кислота	2	54.4	440		
Сероуглерод	10	-30	100	1.3	4.4
ТГФ	100	-20	250	1.8	11.8
1,1,2,2-тетрахлорэтан	5	нет	474		
Тетрахлорэтилен	10	нет			
Толуол	50	4	536	1.4	6.7
1,2,4-трихлорбензол	10	105			
Трифторуксусная кислота	2	нет			
1,2,2-трифтор-1,1,2-трихлорэтан	3000	нет			
2,2,2-трифторэтанол	10				
Трихлорэтилен	10	32	416	10.6	41
Триэтиламин	10	-12		1.2	8.0
Уксусная кислота	5	42	428	5.4	16 ⁽¹⁰⁰⁾
Формамид	3				
Хлорбензол	50	29	638	1.3	7.1
1-Хлорпентан		13		1.6	8.6
Хлористый бензил	0.5	60	585	1.1	
1-Хлорбутан	0.5	-12	460	1.9	10.1

Растворители	ПДК, мг/м ³	$T_{вс}$, °C	$T_{свп}$, °C	Концентрационные пределы воспламенения, об. %	
				нижний	верхний
2-Хлорпропан		-32	592	2.8	10.7
1-Хлорпропан		-17.8	520	2.6	11.1
Хлороформ	20	нет			
Циклогексан	80	-20	260	1.3	8.0
Циклогексанон	10	-18	495		
Циклогексен	50	-6		1.2 ⁽¹⁰⁰⁾	
Циклопентан		-37			
Тетрахлорметан	20	нет			
Этанол	1000	18	392	4.3	19
Этилацетат	200	-4	426	2.5	9.0
Этилбензол	50	20	420	1.0	6.8
Этиленгликоль	4	120	380		

*Примечание. $T_{вс}$ – значения температуры вспышки (приведены без указания метода определения, имеется в виду $T_{вс}$, определенная в закрытом тигле, либо в первоисточнике не был указан метод) $T_{свп}$ – температура самовоспламенения.

5.3. Прозрачность растворителей в ультрафиолетовом свете

Наиболее важным оптическим свойством растворителей является предел пропускания УФ-света, так как УФ-детектор является самым распространенным детектором, используемым в ВЭЖХ (табл. 5.5.). В ОФХ наиболее подходящими растворителями по пределу пропускания УФ света является вода, ацетонитрил и алкано-лы, а в НФХ – алканы, циклоалканы, алкано-лы и простые диалки-лэфиры. Предпочтение к конкретному растворителю из вышеназ-ванных определяется не только чистотой спектрально чистого ве-щества, но и легкостью его очистки от поглощающих примесей, а так же с учетом других физических, химических и эксплуатац-ионных характеристик растворителя.

Согласно закону Бугера – Ламберта – Бера, оптическая плот-ность определяется соотношениями (5.1)

$$A = \lg(1/T) = \lg(I_0/I) = \epsilon lc, \quad (5.1)$$

где T – пропускание, I_0 и I – интенсивности падающего и пропу-щенного света, ϵ – молярный коэффициент поглощения в л/(см·моль), l – толщина поглощающего слоя в см, c – концентрация в моль/л.

Поскольку в любом растворителе присутствуют примеси, его полная спектральная поглощательная способность на данной дли-не волны определяется суммой вкладов каждого компонента

$$A(\lambda) = \epsilon_s(\lambda)l c_s + \sum \epsilon_i(\lambda)l c_i, \quad (5.2)$$

где $\epsilon_s(\lambda)$ и $\epsilon_i(\lambda)$ – молярный коэффициент поглощения раство-рителя и i -той примеси, а c_s и c_i – их концентрации. Следова-тельно, низкие концентрации примесей с большими значениями ϵ или высоки-ми концентрациями c , но с низкими величинами ϵ , приведут к сме-щению предела прозрачности растворителя в длинноволновую об-ласть. Поэтому качество растворителя при УФ-детектировании оп-ределяется не только его собственным поглощением, но и содержа-нием в нем поглощающих загрязнителей.

Таблица 5.4. Давление паров растворителей при 20°C, мм рт. ст.

Растворители	P_v	Растворители	P_v	Растворители	P_v
Амилол	2.7 ⁽²²⁾	1,2-диметокси-этан	61.0	Пропионовая кислота	62 ⁽⁷⁵⁾
Анизол	0.153 ⁽²⁵⁾	1,4-диоксан	27.0	Сероуглерод	298
Анилин	50 ⁽¹⁰²⁾	Дипропиловый эфир	63 ⁽²⁵⁾	ТГФ	132
Ацетон	182	1,2-дихлор-бензол	1.0	1,1,2,2-тетрахлорэтан	5.0
Ацетонитрил	89	1,2-дихлорэтан	62.0	Тетрахлорметан	91.0
Бензальдегид	1.0 ^(26.2)	Диэтиламин	220.0	Тетрахлорэтилен	14.0
Бензиловый спирт	52 ⁽¹²⁵⁾	Диэтиленгли-коль	0.008 ⁽²⁵⁾	Толуол	22.0
Бензол	75	Диэтиловый эфир	442	1,2,4-трихлорбензол	1.1 ⁽⁴⁰⁾
Бензонитрил	18.9 ⁽⁷⁵⁾	Диэтилсульфид	48.7	Трифторуксу-ная кислота	8.8
Бромбензол	5.0 ^(27.8)	Изооктан	50 ⁽²⁵⁾	1,2,2-трифтор-1,1,2-трихлорэтан	326 ⁽²⁵⁾
Бромэтан	386.0	мета-Крезол	155 ⁽¹⁵⁰⁾	2,2,2-трифторэтанол	87.0

Растворители	P_v	Растворители	P_v	Растворители	P_v
Бромформ	9.4 ⁽²⁵⁾	<i>пара</i> -Ксилол	8.7	Трихлорэтилен	58.0
Бутан-2-ол	71.0	Кумол	59 ⁽⁷⁵⁾	Триэтиламин	66.0
Бутан-1-ол	4.1	Мезитилен	1.45	Уксусная кислота	12.0
Бутан-2-ол	18.3 ⁽²⁵⁾	Метанол	96	Формамид	0.35
Изобутанол	8.8	Метилацетат	170	Хлорбензол	9.0
Изопентанол	2.2	Метиленхлорид	349	1-Хлорпентан	31.0
<i>трет</i> -Бутанол	42.0 ⁽²⁵⁾	Метилизобутилкетон	7.5	Хлористый бензил	0.9
Бутилацетат	18.0	2-метоксиэтанол	9.5 ⁽²⁵⁾	1-Хлорбутан	80.6
Бутиронитрил	18.9 ⁽⁷⁵⁾	Муравьиная кислота	42.6 ⁽²⁵⁾	1-Хлорпропан	279
2-Бутоксиэтанол	0.88	Нитробензол	0.26	2-Хлорпропан	523 ⁽²⁵⁾
Вода	17.5	Нитрометан	28.0	Хлороформ	160.0
Гексан	121	1-октанол	0.08 ⁽²⁵⁾	Циклогексан	77.0
Гексан-1-ол	0.82 ⁽²⁵⁾	Пентан	420	Циклогексанон	9.0
Гептан	36	Петролейный эфир	40	Циклогексен	17.0 ⁽⁴⁰⁾
Глицерин	12.9 ⁽¹⁷⁵⁾	2-пиколин	8	Циклопентан	201 ⁽¹⁴⁾
Декан	0.7	Пиперидин	20.0	Этанол	44.0
Диизопропиловый эфир	120	Пиридин	42.0 ⁽¹⁵⁾	Этилацетат	74.0
ДМСО	0.4	Пропан-1-ол	15.0	Этилбензол	9.6 ⁽²⁵⁾
ДМФА	3.0	Пропан-2-ол	32.0	Этиленгликоль	0.092 ⁽²⁵⁾

*Примечания. Цифры в скобках указывают температуру определения показателей (°C) в тех случаях, когда она отличается от указанной в заголовке таблицы.

Если растворитель используется как модификатор с небольшой объемной долей (10 и меньше об. %), требование к его чистоте может быть снижено. В таких случаях дополнительное поглощение элюента составляет примерно 0.1 единицу оптической плотности. Зачастую это бывает приемлемо, несмотря на увеличенный уровень фонового шума, приводящий к более высокому пределу обнаружения, уменьшению линейного рабочего диапазона и пониженную чувствительность.

Чистый ацетонитрил имеет очень низкий предел поглощения (около 190 нм) и низкую оптическую плотность даже при $\lambda=200$ нм (<0.05 единиц А). Почти идеальные спектроскопические качества, вместе с превосходной способностью растворять многие анализы

и другими уникальными хроматографическими свойствами, делают ацетонитрил лидером среди модификаторов для ОФХ.

Вторым в рейтинге модификаторов для ОФХ является метанол. Он имеет предел прозрачности 205 нм. Однако уже при 215 нм его оптическая плотность достигает значения $A=0.3$, а его фоновое поглощение достаточно низко только при $\lambda > 235$ нм ($A < 0.05$), что затрудняет применение метанола в методиках анализа хромофоров, поглощающих в области < 235 нм.

ТГФ, прекрасно растворяющий органические вещества и имеющий достаточно низкий предел прозрачности (212 нм), способен быть модификатором и в ОФХ и в НФХ, однако ТГФ химически нестабилен, легко окисляется кислородом воздуха до пероксидов. В коммерческий растворитель в связи с этим добавляют стабилизаторы, например, ионол (2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенол). Такой растворитель не спектрального сорта имеет максимум поглощения при 270 нм и может использоваться только в эксклюзионной хроматографии с рефрактометрическим детектором, когда поглощение ионола в УФ-свете не важно. В перегнанном ТГФ без стабилизатора накапливаются пероксиды, которые увеличивают фоновое поглощение элюента, химически взаимодействуют с растворами, с поверхностью сорбента и с сорбатом, что приводит к изменению параметров удерживания пиков, к появлению ложных пиков, к уменьшению срока эксплуатации колонки. ТГФ для ВЭЖХ маркируется с указанием срока годности, применять его необходимо с предварительным контролем содержания пероксидов, при необходимости очищенным от них и свежеперегнанным.

Наиболее популярным базовым растворителем в НФХ является гексан. Он имеет предел прозрачности в ближней области УФ-света (195 нм) и небольшое фоновое поглощение во всем диапазоне длин волн. Гексан не обладает хроматографической активностью на силикагеле и плохо растворяет полярные органические вещества, поэтому применяется в сочетании с модификаторами, типичная концентрация которых не превышает 5 об. %. Это пропан-2-ол, этилацетат, галогенпроизводные углеводородов. Из последних часто применяют дихлорметан ($\lambda^*=233$ нм), что позволяет применять смеси гексан – дихлорметан в НФХ хромофоров с максимумом поглощения > 250 нм.

Таблица 5.5. Пределы пропускания УФ-света для разных классов спектрально чистых растворителей [339,367].

Растворители	Пределы пропускания, нм
Вода и ацетонитрил	190-195
Алканы и циклоалканы	190-210
Алканолаы	205-220
Диалкилэфиры, алкоксиалканолаы	210-220
Алкилхлориды и алкилбромиды	220-270
Фреоны	225-245
Алкилацетаты	250-260
Алкиламинаы и алкиламидаы	260-275
Алкилсульфидаы и алкилсульфоксидаы	270-290
Бензол и алкилбензолаы	270-290
Арилхлориды	280-310
Анилин и азотсодержащие гетероциклаы	315-330
Алкилкетонаы	320-340
Сероуглерод	380
Нитроалканы	380

Существует правило: чтобы избежать спектральных артефактов, следует применять подвижную фазу, λ^* которой на 20 нм меньше аналитической длины волнаы. Целесообразно перед выполнением хроматографических исследований регистрировать УФ-спектры исходных растворителей, проверять степень их чистоты.

5.4. Полярность и элюирующая сила (элюотропные рядаы)

В таблице 5.6. приведены параметраы, характеризующие полярность и элюирующую силу растворителей. Первым критерием полярности растворителей, который был использован 100 лет назад в жидкостной хроматографии ее основоположником М.С. Цветом, является *диэлектрическая проницаемость* ϵ_r . Она до сих пор приводится во всех справочниках и монографиях, в которых рассматриваются хроматографические свойства растворителей. В настоящее время ϵ_r измерена для множества чистых и смешанных растворителей [321,358,359,377], ее величина в ряду хроматографических растворителей изменяется от

~2 (алканы) до 111 (формамидаы). Растворители с высокой диэлектрической проницаемостью способны к диссоциации, и поэтому их называют *полярными*, в отличие от *неполярных* растворителей с невысокой ϵ_r . Диэлектрическая постоянная непосредственно связана со способностью растворителя к разделению зарядов и ориентации собственных диполей. Она хорошо характеризует диссоциирующую способность жидкости, т.е. способность растворять электролиты путем их разделения на ионы. Несоввершенством ϵ_r является невозможность с ее помощью описать молекулярные взаимодействия между растворителем и растворенным веществом на молекулярном уровне.

Дипольный момент μ , напротив, определяет полярность растворителя на молекулярном уровне, он характеризует электрические свойства молекулы как системы заряженных частиц. У неполярных молекул в отсутствие внешнего электрического поля он равен нулю, полярные молекулы имеют собственный постоянный дипольный момент, равный произведению расстояния между “центрами тяжести” положительного и отрицательного зарядов на их величину. Вектор μ направлен от отрицательного заряда к положительному. Поляризация вещества во внешнем электрическом поле обусловлена дипольным моментом молекул. Дипольный момент дополняет диэлектрическую проницаемость при характеристике полярности вещества. Существует такой критерий полярности, как *электростатический коэффициент* EF , определяемый как произведение ϵ_r на μ . С учетом его величин и химического строения растворители делят на 4 группы: углеводородные растворители ($EF=0\text{--}7\cdot 10^{-30}$ кл·м), электронодонорные растворители ($EF=7\cdot 10^{-30}\text{--}70\cdot 10^{-30}$ кл·м), гидроксильные растворители ($EF=50\cdot 10^{-30}\text{--}170\cdot 10^{-30}$ кл·м) и биполярные растворители, не являющиеся донорами водородных связей ($EF\geq 170\cdot 10^{-30}$ кл·м) [345]. Кроме доступных из справочников данных по дипольному моменту, найденному экспериментально [316-320], имеются возможности, используя квантовохимические закономерности, рассчитать с достаточно высокой точностью величину μ при помощи специализированных химических программ [124].

Другим широко известным критерием полярности является *параметр растворимости Гильдебранда* δ_r [360,361]. Параметр $\delta_r=c^{1/2}$, где c – значение плотности энергии когезии. Параметр δ_r характеризует

количество работы, затрачиваемой на отделение молекул растворителя друг от друга (т. е. на нарушение всех взаимодействий молекул растворителя), без чего невозможно создание полостей, способных вместить молекулы растворенного вещества. Соответственно, для растворителей, которые склонны к самоассоциации и образованию высокоупорядоченных структур, характерны относительно большие значения δ_r , а в газовой фазе $\delta_r = 0$. Оказалось, что у хорошего растворителя для неэлектролита параметр δ_r , как правило, близок δ_r растворяемого вещества.

Особого внимания заслуживает аномально высокая полярность воды. Параметр растворимости воды равен $52,2 \text{ МПа}^{1/2}$, в то время как у других, приведенных в табл. 5.6 соединений, параметры растворимости лежат в пределах от 14 до $34 \text{ МПа}^{1/2}$.

Параметр растворимости δ_r не лишен недостатков. Основываясь лишь на нем, можно сделать вывод, что хлористый метилен будет вести себя почти так же, как диоксан, а толуол – как этилацетат. Однако на практике между этими растворителями наблюдаются значительные различия. Например, диоксан смешивается с водой в любых соотношениях, в то время как хлористый метилен практически нерастворим в воде. Очевидно, для объяснения различий в поведении веществ с близкой полярностью необходимо уточнение модели, описывающей полярность.

Общая плотность энергии когезии представляет собой сумму вкладов дисперсионных, ориентационных, индукционных и кислотно-основных взаимодействий (5.3)

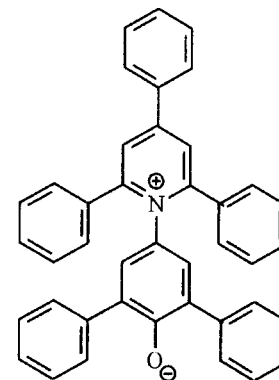
$$\delta_r^2 = \delta_d^2 + 2\delta_{in}\delta_d + \delta_o^2 + 2\delta_a\delta_b, \quad (5.3)$$

где δ_d – парциальная полярность, соответствующая способности растворителя к дисперсионным взаимодействиям, δ_{in} – способность к индукционным взаимодействиям, δ_o – ориентационная составляющая, δ_a – составляющая, описывающая кислотные свойства, а δ_b – составляющая, описывающая основные свойства. В уравнении (5.3) встречаются два различных вида членов. Дисперсионное и ориентационное взаимодействия представлены квадратными членами, а значения, отвечающие кислотно-основному и индукционному взаимодействию, выражены в виде удвоенных произведений. Первые два типа взаимодействий называют симметричными, поскольку две уча-

ствующие в них молекулы одинаковы. В двух других типах взаимодействия различные молекулы играют различную роль. Либо одна молекула активно индуцирует диполь в другой, пассивной молекуле, либо первая ведет себя как кислота, а вторая – как основание.

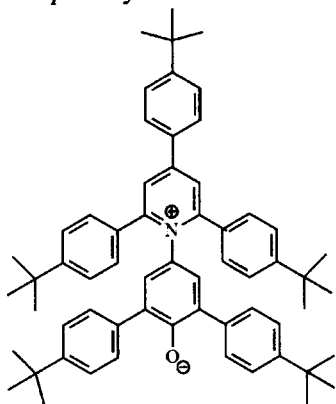
В отличие от диэлектрической проницаемости, критерий δ_r хорошо характеризует способность жидкости растворять неэлектролиты. Растворяющая способность растворителя тем выше, чем ближе величина δ_r растворителя к δ_r растворяемого вещества. Зачастую оптимальным растворителем является смесь двух растворителей, один из которых имеет более высокое, а другой более низкое значение параметра δ_r по сравнению с растворенным веществом.

Широко применяют в хроматографии *сольватохромный параметр Димрота – Райхардта* $E_T(30)$ [345]. Он вычисляется на основании спектроскопических измерений взаимодействия растворителя со стандартным N-феноксипиридинийбетаиновым красителем:



Энергия электронного перехода полосы переноса заряда характеризует степень полярности растворителя. Чем выше величина $E_T(30)$, тем полярней растворитель. Краситель выступает химическим сенсором, реагирующим на суммарный эффект парциальных полярностей, которые для величины $E_T(30)$ не дифференцированы. Основное преимущество выбранного красителя заключается в том, что для него зависящая от растворителя полоса поглощения расположена в широкой области длинных волн, что позволяет регистрировать сольватохромный эффект в чрезвычайно широком диапазоне – от $\lambda = 810 \text{ нм}$ (дифениловый эфир; $E_T(30) = 147.7 \text{ кДж/моль}$) до $\lambda = 453 \text{ нм}$ (вода,

$E_r(30)=264.0$ кДж/моль). Поскольку большая часть этого диапазона приходится на видимую область спектра, то с помощью этого бетаинового красителя полярность растворителей можно оценивать даже визуально. Действительно, его раствор имеет красный цвет в метаноле, фиолетовый – в этаноле, зеленый – в ацетоне, голубой – в изоамиловом спирте и желто-зеленый – в анизоле [345]. С помощью бинарных смесей растворителей различной полярности можно получить раствор бетаинового красителя практически любого цвета видимого спектра. До настоящего времени неизвестно другое соединение, гипсохромный сдвиг которого был бы так же велик, как у рассматриваемого бетаинового красителя. При переходе от раствора в дифениловом эфире к водному раствору экспериментально наблюдается гипсохромный сдвиг, превышающий 350 нм. В силу такого исключительно большого индуцированного растворителями смещения полосы поглощения параметр $E_r(30)$ является очень удобной и чувствительной мерой полярности растворителей, причем большие величины $E_r(30)$ соответствуют более полярным растворителям. Определены параметры $E_r(30)$ более 270 чистых органических растворителей и большого числа бинарных смесей растворителей. Стандартный бетаиновый краситель, однако, мало растворим в воде и менее полярных средах и совсем нерастворим в неполярных средах, например, в гексане. Для решения проблемы определения параметра $E_r(30)$ в неполярных средах в качестве вспомогательного красителя предложен более липофильный бетаиновый краситель, содержащий в *пара*-положении пяти фенильных радикалов *трет*-бутильные заместители:



Параметр полярности P' предложен выдающимся теоретиком в области жидкостной хроматографии Снайдером. Параметр P' находят по формуле (5.4).

$$P' = \lg K''_e + \lg K''_d + \lg K''_n \quad (5.4)$$

где $\lg K''_i$ – эмпирически модифицированные коэффициенты распределения стандартных веществ (этанола, диоксана и нитрометана) между паровой фазой и испытуемым растворителем [63,90-93,113]. Индексы e , d и n обозначают этанол, диоксан и нитрометан.

Величина $X_e = \lg K''_e / P'$ характеризует способность растворителя быть донором протонов, $X_d = \lg K''_d / P'$ – способность растворителя выступать акцептором протонов, а $X_n = \lg K''_n / P'$ характеризует его возможности вступать в сильные дипольные взаимодействия. Параметры селективности X_i связаны между собой соотношением (5.5)

$$X_e + X_d + X_n = 1 \quad (5.5)$$

Величина P' определяется экспериментально методом газовой хроматографии. Этот критерий используют не только для характеристики полярности, но и для оценки элюирующей способности растворителя в распределительной НФХ. Вода в шкале P' имеет очень высокую полярность, насыщенные углеводороды – очень низкую.

Поскольку параметр P' основан на эмпирической интерпретации данных, полученных методом ГХ, он оказался не совсем точным для количественной оценки полярности в ЖХ. Например, из величины параметра P' следует, что ацетонитрил более полярен, чем метанол. По данным для δ_r , картина получается обратной. На практике в ЖХ метанол оказывается действительно полярней, чем ацетонитрил, т.е. полярность (элюирующую способность) смеси растворителей можно точнее оценить, исходя из параметров растворимости δ_r .

Снайдер разбил 81 исследованный растворитель на восемь классов, которые в треугольной диаграмме с осями селективности X_e , X_d и X_n группируются в ограниченных (частично перекрывающихся) областях треугольника. Эти классы были пронумерованы Снайдером следующим образом: I группа – диалкилэфиры; II – алканола; III – производные пиридина, ТГФ, сульфоксиды; IV – гликоли, уксусная кислота; V – дихлорметан, 1,2-дихлорэтан; в VI группе выделены два подкласса (а и б), VIa группа – диалкилкетоны, сложные эфиры и диоксан; VIb группа – сульфоны, нитрилы. Впрочем, оказалось, что это деление не пред-

ставляет практического интереса. VII группа – ароматические углеводороды, галогензамещенные ароматические углеводороды, нитросоединения, ароматические сложные эфиры; VIII группа – фторалканола, вода. Отвечающий хлороформу небольшой круг в левом нижнем углу треугольника находится вне окружности, обозначающей группу VIII растворителей, но близок к ней. Аналогично триэтиламин выпадает из классификации, не входит, но примыкает к группе I. Полный перечень индивидуальных растворителей по классам приведен в работе [63]. Из этой работы следует, что химически подобные соединения, например, гомологи входят в один класс, но в то же время группироваться могут и соединения, сильно различающиеся по химической структуре. Хорошим примером этого является VII группа. Важное практическое следствие из такой классификации состоит в том, что, если какой-либо растворитель, например, этилацетат, не обеспечивает приемлемой хроматографической селективности, маловероятно, что другой растворитель из этой же группы сможет ее обеспечить.

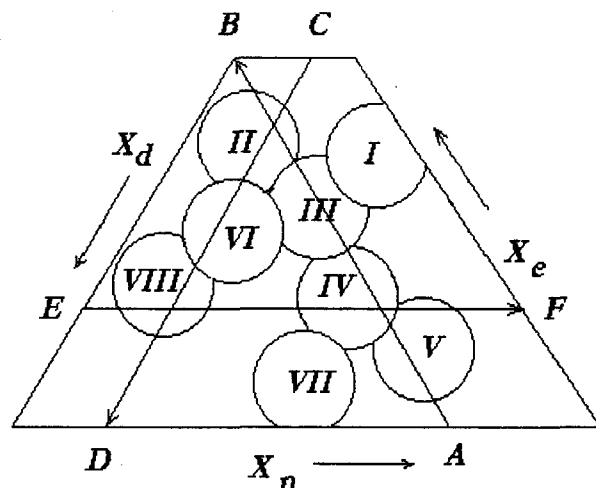


Рис. 5.1. Классификация растворителей по Снайдеру. Кругами с римскими цифрами выделены области, в которых группируются растворители по селективности. X_e – способность к протонодонорным взаимодействиям, X_d – способность к протонакцепторным взаимодействиям, X_n – способность к диполь-дипольным взаимодействиям. АВ, CD и EF – тренды изменения способности к соответствующим взаимодействиям

Таблица 5.6. Параметры полярности и элюирующей способности растворителей при 25°C

Растворители	ϵ_r	μ, D	$\delta_T, \text{МПа}^{1/2}$	$E_T(30), \text{кДж/моль}$	P'	$\epsilon^\circ(\text{SiO}_2)$	$\epsilon^\circ(\text{Al}_2\text{O}_3)$
Амилол	13.90	1.80	20.05	205.4	3.5	0.47	0.61
Изоамилол	14.70	1.82		205.0	3.6		0.61
Анизол	4.33	1.25	18.61	155.2	3.5		
Анилин	6.99	1.51	21.1	185.3	6.3		0.62
Ацетон	20.54	2.70	21.50	176.6	5.1	0.50	0.58
Ацетонитрил	35.94	3.44	26.90	190.8	5.8	0.60	0.55
Бензальдегид	17.8	2.77					
Бензиловый спирт	16.3	1.66		210.9	5.5		
Бензол	2.23	0.0	19.86	143.5	2.7	0.25	0.32
Бензонитрил	25.20	4.05	21.89	173.6	4.6		
Бромбензол	5.40	1.73	20.25	153.1	2.7		
Бромэтан	5.40	2.01	18.00	157.3	3.1	0.29	0.38
Бромформ	4.40	0.99		157.7			
Бутан-2-он	18.51	2.78	20.37	172.8	4.7	0.40	0.51
Бутан-1-ол	17.10	1.66	23.30	210.1	3.9		0.70
Бутан-2-ол	16.40	1.55	22.09	197.1	4.0		
Изобутанол	18.50	1.79	20.86	203.3	4.0		
трет-Бутанол	12.47	1.66	21.70	183.6	4.1	0.47	0.61
Бутилацетат	5.10	1.84	17.39	161.1			
Бутиронитрил	20.3	3.57		180.3			
2-Бутоксигэтанол	9.30	2.08	18.41	210.0			0.74
Вода	78.54	1.83	52.20	264.0	10.2	1.50	
Гексан	1.88	0.08	15.84	129.7	0.1	0.01	0.01
Гексан-1-ол	13.30	1.72	21.89	204.2			
Гептан	1.93	0.0	16.18	130.1	0.2	0.01	0.01
Глицерин	42.5	2.56		238.5			
Декан	2.00	0.0	15.95	130.1	-0.3	0.03	0.04

продолжение таблицы 5.6.

Растворители	ϵ_r	μ, D	$\delta_T,$ МПа ^{1/2}	$E_T(30),$ кДж/моль	P'	$\epsilon^o(SiO_2)$	$\epsilon^o(Al_2O_3)$
Диизопропиловый эфир	3.88	1.13	14.52	142.7	2.4	0.28	0.28
ДМСО	48.50	3.96	26.18	188.7	6.4	0.58	0.75
ДМФА	36.71	3.8	24.14	183.3	6.4		
1,2-диметоксигетан	7.20	1.71		159.8			
1,4-диоксан	2.21	0.45	21.78	150.6	4.8	0.60	0.61
Дипропиловый эфир	3.39	1.32		142.3			
о-Дихлорбензол	9.93	2.27	21.71	159.0	2.7		
1,2-дихлорэтан	10.38	1.86	21.76	172.8	3.8	0.32	0.44
Диэтиламин	3.80	1.11		148.1			0.63
Диэтиленгликоль	29.40	2.31	26.80	225.1	5.0		
Диэтиловый эфир	4.27	1.15	16.20	144.4	2.8	0.43	0.38
Диэтилсульфид	5.72	1.58	17.59				0.38
Изооктан	1.94	0.0	14.99	130.1	0.1	0.01	0.01
мета-Крезол	11.80	1.54		223.4	7.0		
пара-Ксилол	2.27	0.02	17.94	138.5	2.4		0.26
Кумол	2.38 ⁽²⁰⁾	0.85					
Мезитилен	2.28	0.0		137.6			
Метанол	32.66	1.70	32.42	231.8	5.1	0.70	0.95
Метилацетат	6.68	1.61	18.82	167.4			0.60
Метилизобутилкетон	13.1	2.79	17.18	164.8	4.2		0.43
2-Метоксиэтанол	15.90	2.36	17.39	218.8	5.5		0.74
Муравьиная кислота	58.0	1.41	24.75	227.2			
Нитробензол	35.50	4.03	22.70	165.8	4.5		

продолжение таблицы 5.6.

Растворители	ϵ_r	μ, D	$\delta_T,$ МПа ^{1/2}	$E_T(30),$ кДж/моль	P'	$\epsilon^o(SiO_2)$	$\epsilon^o(Al_2O_3)$
Нитрометан	37.78	3.56	27.70	193.3	6.0	0.49	0.64
Октан-1-ол	10.00	1.76	21.70	194.4	3.4		
Пентан	1.84	0.0	15.65	129.7	0	0	0
Петролейный эфир	1.9	0					0.01
2-пиколлин	9.85	1.97		160.2	4.8		
Пиперидин	5.80	1.17					
Пиридин	12.4	2.37	21.27	169.5	5.3	0.55	0.71
Пропан-1-ол	20.33	1.657	25.10	212.2	4.0	0.55	0.82
Пропан-2-ол	19.13	1.66	25.30	202.5	3.9	0.55	0.82
Пропионовая кислота	3.37	1.68		210.0			
Сероуглерод	2.60	0.06	20.45	137.2	1.0	0.12	0.15
ТГФ	7.39	1.75	20.21	156.5	4.0	0.44	0.51
1,1,2,2-тетрахлорэтан	8.1	1.85		164.8			
Тетрахлорэтилен	2.4	0.0	19.02				
Толуол	2.37	0.36	19.49	141.8	2.4	0.23	0.30
Толуол	2.37	0.36	19.49	141.8	2.4	0.23	0.30
1,2,4-трихлорбензол	3.9	1.52		151.5			
Трифторуксусная кислота	8.26	2.28					
1,2,2-трифтор-1,1,2-трихлорэтан	2.41	0.09	14.52				0.02
2,2,2-трифторэтанол	26.67	2.52		250.2			
Трихлорэтилен	3.40	0.9	19.02	150.2			
Триэтиламин	2.42	0.66	15.34	134.3	1.9	0.42	0.54

Растворители	ϵ_r	μ, D	$\delta_T, \text{МПа}^{1/2}$	$E_T(30), \text{кДж/моль}$	P'	$\epsilon^\circ(\text{SiO}_2)$	$\epsilon^\circ(\text{Al}_2\text{O}_3)$
Уксусная кислота	6.30	1.7	20.70	216.4	6.0		>1
Формамид	111.0	3.37	36.61	237.2	7.3		
Хлорбензол	5.62	1.53	19.40	156.9	2.7	0.24	0.31
1-Хлорпентан	6.6	2.12					0.26
Хлористый бензил	7.0	1.86					
1-Хлорбутан	7.4	2.11	18.24		1.0		0.26
2-Хлорпропан		2.02	17.18				0.29
Хлористый метилен	8.93	1.14	21.85	170.3	3.1	0.30	0.40
1-Хлорпропан	8.1	1.97	16.97	156.5			0.30
Хлороформ	4.72	1.15	20.19	163.5	4.1	0.26	0.36
Циклогексан	2.02	0.0	16.77	129.4	0.2	0.02	0.04
Циклогексанон	18.3 ⁽²⁰⁾	3.01	20.3	166.5	4.5		
Циклогексен	2.22	0.51					
Циклопентан	1.97	0.0	16.57		0.1		0.05
Тетрахлорметан	2.23	0.0	17.59	135.5	1.6	0.11	0.18
Этанол	24.55	1.68	27.92	217.1	4.3	0.60	0.88
Этилацетат	6.02	1.88	19.58	159.5	4.4	0.48	0.60
Этилбензол	2.4	0.35	17.98				
Этиленгликоль	37.7	2.28	34.77	235.6	6.9	0.85	1.11

Примечание. Цифры в скобках указывают температуру определения показателей ($^{\circ}\text{C}$) в тех случаях, когда она отличается от указанной в заголовке таблицы

Для измерения *элюирующей способности* в адсорбционной ЖХ Снайдером предложена безразмерная величина ϵ° , которая определяется как энергия адсорбции растворителя, отнесенная к площади адсорбента, занятой растворителем [63, 90-93]. Элюирующая способность зависит не только от растворителя, но и от адсорбента и других условий, принятых за стандартные. Исторически сложилось,

Таблица 5.7. Парциальные параметры растворимости растворителей некоторых растворителей ($\text{МПа}^{1/2}$)*

Соединение	δ_T	δ_d	δ_o	δ_{in}	δ_a	δ_b
Вода	52.20	14.73	Большая	Большая	44.39	29.04
Метанол	32.42	14.73	7.98	0.20	34.98	11.05
Ацетонитрил	26.90	14.93	11.86	0.41	20.45	8.18
Метиленхлорид	21.85	16.36	8.96	2.05	8.18	2.05
Диоксан	21.78	16.57	2.45	6.95	мала	4.10
Тетрагидрофуран	20.21	16.36	6.75	0.61	12.68	3.07
Толуол	19.49	17.39	1.64	1.43	16.36	0.82
Этилацетат	19.58	15.54	7.36	2.86	7.16	2.05
Гексан	15.84	15.84	0	0	0	0

Примечание:* $1 \text{ МПа}^{1/2} = 0.4889 \text{ кал}^{1/2} \cdot \text{см}^{-3/2}$

что для сравнения элюирующей способности растворителей используют параметры ϵ° , определенные на оксиде алюминия $\epsilon^\circ(\text{Al}_2\text{O}_3)$ и силикагеле $\epsilon^\circ(\text{SiO}_2)$.

Величины $\epsilon^\circ(\text{Al}_2\text{O}_3)$ и $\epsilon^\circ(\text{SiO}_2)$ коррелируют между собой, для них характерно следующее соотношение [58]:

$$\epsilon^\circ(\text{SiO}_2) = 0.77 \epsilon^\circ(\text{Al}_2\text{O}_3), \quad (5.6)$$

Элюирующая способность S в ОФХ определяется из экспериментальных линейных зависимостей логарифмов факторов удерживания от объемной доли органического модификатора в ПФ, в которых свободным членом является фактор удерживания при использовании воды в качестве элюента:

$$\lg k = \lg k_1 - S \varphi_2, \quad (5.7)$$

где k_1 – фактор удерживания (по принятой ранее терминологии – коэффициент емкости) при использовании воды в качестве элюента, а φ_2 – объемная доля органического модификатора в подвижной фазе [13,55,252]. В табл. 5.8. приведены 2 шкалы элюирующей способности для ОФХ.

В зависимости от механизма сорбции с увеличением полярности элюирующая сила растворителя закономерно возрастает или уменьшается. Типичные растворители, используемые в сепарационных процессах, располагают в ряды в порядке возрастания элюирующей силы. Эти ряды называют элюотропными. Практически все хроматографические растворители располагаются в элюотропных рядах

между неполярными алканами и полярной водой. Менее полярны, чем алканы, только перфторалканы, применение которых ограничено из экологических и экономических соображений. Более полярны, чем вода (по величине ϵ_r), формамид и вторичные амиды.

Упомянутые критерии полярности и элюирующей силы направляют похожие в большей или меньшей степени порядки изменения полярности растворителей, т.е. между разными шкалами полярности (элюотропными рядами) прослеживаются приближенные корреляции. Вместе с тем, в отдельных случаях некритичное использование конкретного критерия может приводить к промахам в оценке хроматографических свойств подвижной фазы, так как ни один из них не учитывает в полной мере всего комплекса взаимодействий и явлений, сопутствующих хроматографическому процессу.

Так, диэлектрическая проницаемость диоксана по величине $\epsilon_r = 2.2$ близка к ϵ_r малополярных алканов ($\epsilon_r \approx 1.9$), и в то же время в условиях НФХ диоксан проявляет на порядок (в 40-50 раз) более высокую элюирующую способность, чем алканы.

Наиболее подходящий для ОФХ по физико-химическим свойствам ацетонитрил показывает большую полярность по критерию P' , чем метанол, однако экспериментально метанол ведет себя как более полярный модификатор.

Таблица 5.8. Элюотропные ряды растворителей для обращенно-фазовой хроматографии

Растворитель	S [13]	$\epsilon^0(C_{18})$ [339]
ацетон	3.4	8.8
ацетонитрил	3.1	3.1
ДМФА	-	7.6
диоксан	3.5	11.7
метанол	3.0	1.0
пропан-1-ол	-	10.1
пропан-2-ол	4.2	8.3
ТГФ	4.4	3.7
этанол	3.6	3.1
вода	0	-

К недостаткам параметра δ_r относят чрезмерно большой вклад в суммарный показатель дисперсионной составляющей δ_r , которая меняется слишком незначительно при переходе от одного растворителя к другому [13].

Сопоставление существующих элюотропных рядов позволяет констатировать, что они отражают реальную элюирующую силу растворителей только в общих чертах. В сложной многокомпонентной хроматографической системе могут проявить себя факторы, к которым тот или иной параметр полярности либо малочувствителен, либо, наоборот, сверхчувствителен. Райхардт, проанализировав в [345] различные линейные комбинации существующих эмпирических критериев полярности растворителей, показал, что статистически усредненные параметры, не связанные непосредственно с каким-либо определенным, специально подобранным и хорошо изученным

Таблица 5.9. Классификация растворителей по Снайдеру [53]

Растворитель	P'	X_e	X_d	X_n	Группа селективности
Этанол	4.3	0.52	0.19	0.29	II
Диоксан	4.8	0.36	0.24	0.40	VIa
Нитрометан	6.0	0.28	0.31	0.40	VII
Метанол	5.1	0.48	0.22	0.31	II
Пропан-1-ол	4.0	0.54	0.19	0.27	II
Пропан-2-ол	3.9	0.55	0.19	0.27	II
Бутан-1-ол	3.9	0.59	0.19	0.25	II
трет-Бутанол	4.1	0.56	0.20	0.24	II
Изоамиловый спирт	3.7	0.56	0.19	0.26	II
Октан-1-ол	3.4	0.56	0.18	0.25	II
Бензол	2.7	0.23	0.32	0.45	VII
Толуол	2.4	0.25	0.28	0.47	VII
Хлорбензол	2.7	0.23	0.33	0.44	VII
Гексан	0.1	мала	мала	мала	нет
Диизопропиловый эфир	2.4	0.48	0.14	0.38	I
Дихлорметан	3.1	0.29	0.18	0.53	V
ТГФ	4.0	0.38	0.20	0.42	III
Хлороформ	4.1	0.25	0.41	0.33	близко к VIII
Ацетонитрил	5.8	0.31	0.27	0.42	VIb
Вода	10.2	0.37	0.37	0.25	VIII

стандартным процессом, могут быть успешно использованы в рутинных экспериментальных исследованиях как средство управления химическими и физико-химическими процессами. Суммирование величин, имеющих различный физический смысл, но выраженных в безразмерных величинах, в рамках математических и статистических методов повсеместно используется к химическим измерениям в хемометрике с целью оптимизации того или иного процесса или для максимального извлечения новой информации [345,367]. Взять, к примеру, многопараметрические уравнения Камлета, Тафта, Свэна, в которых коэффициенты статистически усреднены, оптимизированы, причем основой одного из наборов параметров являются характеристики 77 различных процессов, зависящих от растворителей [345]. Некоторые эмпирические критерии полярности растворителей представляют собой комбинацию из нескольких физико-химических параметров растворителей и растворенных веществ.

Так как приведенные выше критерии полярности нередко дают противоречивые оценки полярности отдельных растворителей, в работах [324,365] Рудаков с соавторами предложил для 32 растворителей обобщенный параметр, включающий величины P' , δ_T , ϵ_T и $E_T(30)$.

Исходные параметры полярности преобразовали в безразмерные величины от 0 до 1 по уравнению

$$P_i = (D_i - D_{\min}) / (D_{\max} - D_{\min}), \quad (5.8)$$

где P_i – нормализованный параметр для i -го растворителя, D_i – исходный параметр, D_{\max} и D_{\min} – максимальное и минимальное значения D_i . Найдя среднее арифметическое P_i , получили усредненную шкалу полярности растворителей. Нормализованный усредненный параметр обозначили как P° , а шкалу назвали рациональной, подчеркивая ее хемометрическое происхождение. Шкала P° получена в результате применения арифметических действий к независимым переменным и являются простой разновидностью рациональной функции – средним арифметическим от нормализованных аргументов P' , δ_T , ϵ_T и $E_T(30)$. Между P° и элюирующей силой ϵ° на силикагеле и оксиде алюминия во всем диапазоне полярности наблюдаются линейные корреляции

$$\epsilon^\circ(\text{SiO}_2) = \alpha P^\circ, \quad (5.9)$$

где $\alpha = 1.45$, $n = 27$, $R = 0.92$;

$$\epsilon^\circ(\text{Al}_2\text{O}_3) = \beta P^\circ, \quad (5.10)$$

где $\beta = 2.03$, $n = 27$, $R = 0.94$.

Рациональная шкала хорошо согласуется с расширенной классификацией органических растворителей [345], в рамках которой рассматриваемые растворители разбиваются на четыре группы: а) апротонные неполярные растворители – алканы, арены, их галогенпроизводные и триэтиламин (АНР); б) апротонные малополярные растворители – ациклические и циклические простые эфиры, этилацетат (АМР); в) апротонные полярные растворители – кетоны, диметилформамид, нитрометан, ацетонитрил (АПР); г) протонные полярные растворители – вода, спирты, уксусная кислота (ППР). При сортировке растворителей по этой схеме в трех последовательностях АНР-АМР-АПР, АНР-ППР и АПР-ППР корреляции (5.9) и (5.10) становятся теснее. Коэффициенты парной корреляции в этих выборках находятся в диапазоне $R = 0.97-0.99$. По сути дела, мы приходим к трехкоординатной диаграмме, аналогичной диаграмме селективности растворителей по Снайдеру.

Обращенно-фазовый эмпирический параметр элюирующей силы S обратно пропорционален P° .

$$S = 5.2 - 4.8 P^\circ, \quad (5.11)$$

$R = 0.93$, $n = 7$.

Значимый коэффициент корреляции имеет место и для соотношения

$$\epsilon^\circ(\text{C}_{18}) = A - B P^\circ, \quad (5.12)$$

где $A = 19.4$, $B = 32.9$, $n = 8$, $R = 0.87$, если исключить из рассмотрения неожиданно низкое значение $\epsilon^\circ(\text{C}_{18})$ для тетрагидрофурана.

Факт коррелированности эмпирических значений ϵ° и S от параметра P° говорит о применимости рациональной шкалы в прогнозе элюирующей силы растворителей. Причем в большинстве случаев эти корреляции выражены лучше, чем для парциальных критериев полярности P' , δ_T , ϵ_T и $E_T(30)$.

Если сравнить рациональную шкалу полярности P° с рядами растворителей, найденными в итоге многомерного регрессионного или факторного анализа, с таким же или большим числом растворителей и с использованием в 2-10 раз большего числа дескрипторов (физико-химических констант и эмпирических параметров полярности – темпера-

туры плавления, температуры кипения, плотности, диэлектрической проницаемости, дипольного момента, показателя преломления, сольватохромных параметров, растворимости Гильдебранда и т. д.), можно заметить, что на качественном уровне рациональная шкала хорошо согласуется с результатами более сложных хемометрических методов структуризации химических данных для растворителей. В рамках этой шкалы не кардинально изменяется элюирующая сила большинства растворителей, одновременно достигается эффект сглаживания аномально низких или, наоборот, высоких значений полярности отдельных растворителей, обусловленных специфической чувствительностью того или иного критерия к одной из парциальных полярностей.

В работах [375,376] описан редуکتивный критерий полярности P_N , который получен по такому же алгоритму, что и рациональный критерий P^o . Его отличие заключается в том, что он получен путем обобщения параметров P' , δ_T , ϵ , и $E_A(30)$ большего числа растворителей. В него включены дополнительно 10 растворителей, которые применяются не только в НФХ и ОФХ на колонках, но и в эксклюзионной хроматографии полимеров и в планарной хроматографии. В связи с тем, что в рассмотренной выборке не оказалось ни одного растворителя, для которого все 4 обобщаемых параметра минимальны или максимальны, процедуру нормализации повторили. Для практического удобства максимальное значение критерия полярности для воды приняли за 100, минимальное значение критерия для декана приравняли нулю.

Между критериями P_N и P^o есть четкая линейная зависимость ($R=0.999$):

$$P_N = 101.22P^o - 0.28. \quad (5.13)$$

Из этого следует, что качественные выводы, сделанные для P^o , справедливы и для редуکتивной шкалы.

Проиллюстрируем связь между селективностью растворителей по Снайдеру и редуکتивным критерием. Для всего массива данных находим:

$$\epsilon^o(\text{SiO}_2) = 0.0146P_N, \quad (5.14)$$

$$n = 37, R = 0.92;$$

$$\epsilon^o(\text{Al}_2\text{O}_3) = 0.0189P_N, \quad (5.15)$$

$$n = 37, R = 0.94.$$

Если учесть селективность растворителей и между неполярными алканами и полярной водой разместить растворители только II, III V, и VIa групп селективности, лежащих на одной линии в треугольной диаграмме селективности, по Снайдеру, параллельной параметру донора протонов X_c , исключив специфические растворители и растворители других групп, параметры селективности которых отдалены от выбранного тренда АВ (рис. 5.1), корреляции (5.14) и (5.15) становятся существенно теснее:

$$\epsilon^o(\text{SiO}_2) = 0.0152P_N, \quad (5.14a)$$

$$n = 23, R = 0.97;$$

$$\epsilon^o(\text{Al}_2\text{O}_3) = 0.020P_N, \quad (5.15a)$$

$$n = 23, R = 0.98.$$

Аналогично, для тренда CD, параллельного параметру акцептора протонов X_d (алканы, растворители II и IV групп, вода), получаем

$$\epsilon^o(\text{SiO}_2) = 0.0145P_N, \quad (5.14b)$$

Таблица 5.10. Обобщенные критерии полярности растворителей P^o и P_N

Растворитель	P^o	P_N	Растворитель	P^o	P_N
Декан		0.00	Октан-1-ол		28.85
Изооктан	0.012	0.32	Бутан-2-он	0.322	29.03
Пентан	0.013	0.45	Пиридин		29.04
Циклогексан	0.016	0.71	<i>трет</i> -Бутанол	0.292	29.12
Гексан	0.017	0.85	Пентан-1-ол		31.25
Гептан	0.022	1.44	Бензонитрил		31.72
Триэтиламин	0.067	6.24	Ацетон	0.356	32.18
Тетрахлорметан	0.076	7.29	Нитробензол		33.00
Сероуглерод		8.25	бутан-1-ол	0.362	36.29
Диизопропиловый эфир	0.094	9.02	пропан-2-ол	0.366	36.72
Диэтиловый эфир	0.120	11.73	Уксусная кислота	0.385	38.45
Толуол	0.133	12.07	Пропан-1-ол	0.434	39.09
Бензол	0.165	13.44	ДМФА	0.452	42.88
Хлорбензол	0.207	16.65	Этанол	0.436	43.97
Бромэтан		16.72	Ацетонитрил	0.452	44.66
ТГФ	0.209	21.00	Нитрометан	0.472	46.72
1,4-Диоксан	0.214	21.71	ДМСО		48.41
Этилацетат	0.214	21.84	Метанол	0.537	54.34
Хлороформ	0.227	22.00	Этиленгликоль	0.619	62.77
Метиленхлорид	0.245	23.04	Формамид		83.83
Дихлорэтан	0.286	24.88	Вода	1.00	100.00

$$n = 19, R = 0.98;$$

$$\varepsilon^{\circ}(\text{Al}_2\text{O}_3) = 0.0193P_N \quad (5.156)$$

$$n = 19, R = 0.98.$$

Для тренда FE , параллельного параметру диполь-дипольного взаимодействия X_n (алканы, растворители V, VI, VII групп, вода) получаем:

$$\varepsilon^{\circ}(\text{SiO}_2) = 0.0147P_N, \quad (5.146)$$

$$n = 22, R = 0.96;$$

$$\varepsilon^{\circ}(\text{Al}_2\text{O}_3) = 0.0184P_N, \quad (5.156)$$

$$n = 22, R = 0.97$$

Величины S и $\varepsilon^{\circ}(\text{C}_{18})$ для ОФХ обратно пропорциональны P_N . Так,

$$S = 5.39 - 0.05P_N \quad (5.16)$$

$$n = 8, R = 0.93.$$

Таким образом, критерий P_N хорошо согласуется с классификацией растворителей по Снайдеру и при совместном использовании позволяет решать задачу выбора растворителя для ЖХ, учитывая и элюирующую силу, и селективность растворителя.

5.5. Смешиваемость (миксотропный ряд)

При приготовлении смешанных подвижных фаз, при регенерации колонок, переводе их на другой вариант ЖХ, при подготовке пробы для анализа важна информация о взаимной растворимости и совместимости растворителей. Эта информация полезна также для подбора экстрагентов. Зачастую при подготовке пробы в воде, почве, продуктах, биоматериалах требуется выделить и сконцентрировать аналит. Взаимную растворимость двух веществ определяет не правило “подобное растворяется в подобном”, а взаимодействия между молекулами растворенного вещества и растворителя. Соединение A растворяется в растворителе B только тогда, когда силы взаимодействия $A \cdots B$ в растворе могут преодолеть межмолекулярные силы притяжения $A \cdots A$ и $B \cdots B$, действующие в соответствующих чистых соединениях. Суммарный эффект взаимодействий между молекулами растворителя и растворенного вещества можно связать с *полярностью* A и B . Назвав сильно взаимодействующими

соединения $A \cdots A$ и $B \cdots B$ полярными, а слабо взаимодействующие – неполярными, можно различать четыре ситуации, позволяющие качественно предсказать взаимную растворимость веществ (табл. 5.11). Если взаимодействия $A \cdots A$ и $B \cdots B$ при смешивании трудно разрушить, наиболее вероятна низкая растворимость.

Данные о взаимной растворимости некоторых органических растворителей суммированы на рис. 5.2. В табл. 5.2. даны величины растворимости органических растворителей в воде и воды в них, а в табл. 5.12. приведен классический *миксотропный ряд* растворителей [135].

Этот миксотропный ряд подобен элюотропным рядам для адсорбционной хроматографии, на что указывает его приблизительное соответствие обобщенным шкалам полярности. Но наиболее тесно эмпирически установленный ранг растворителей в данном миксотропном ряду коррелирует с коэффициентом распределения в системе октан-1-ол – вода. Растворители, расположенные в миксотропном ряду выше *трет*-бутанола, смешиваются с водой и между собой в любых соотношениях. Для них характерны отрицательные или близкие к нулю значения критериев гидрофобности H , а экспериментальные и расчетные величины $\log P \leq 0.6$. Последние взяты из справочной базы известной программы ChemOffice 2002, разработанной корпорацией CambridgeSoft [124]. Вместе с тем есть растворители, проявляющие аномально низкую или высокую смешиваемость с водой. Например, сравнительно малополярные ТГФ и ди-

Таблица 5.11. Качественная взаимосвязь между растворимостью и полярностью

Вещество A	Растворитель B	Взаимодействие			
		$A \cdots A$	$B \cdots B$	$A \cdots B$	Растворимость A в B
Неполярное	Неполярный	Слабое	Слабое	Слабое	Может быть высокой
Неполярное	Полярный	Слабое	Сильное	Слабое	Вероятно, низкая
Полярное	Неполярный	Сильное	Слабое	Слабое	Вероятно, низкая
Полярное	Полярный	Сильное	Сильное	Сильное	Может быть высокой

оксан смешиваются с водой в любых соотношениях, а нитрометан в 2 раза более полярный, чем они, смешивается с водой ограниченно.

Углеводороды и их галогенпроизводные, простые и сложные эфиры, высшие спирты также прекрасно смешиваются между собой. Такие растворители, как ТГФ, пропан-2-ол, диоксан, проявляют хорошую растворимость и в воде, и в неполярных средах.

Особую осторожность следует принимать при работе с буферными растворами и ион-парными реагентами. При их смешении с водорастворимыми органическими растворителями возможно вы-

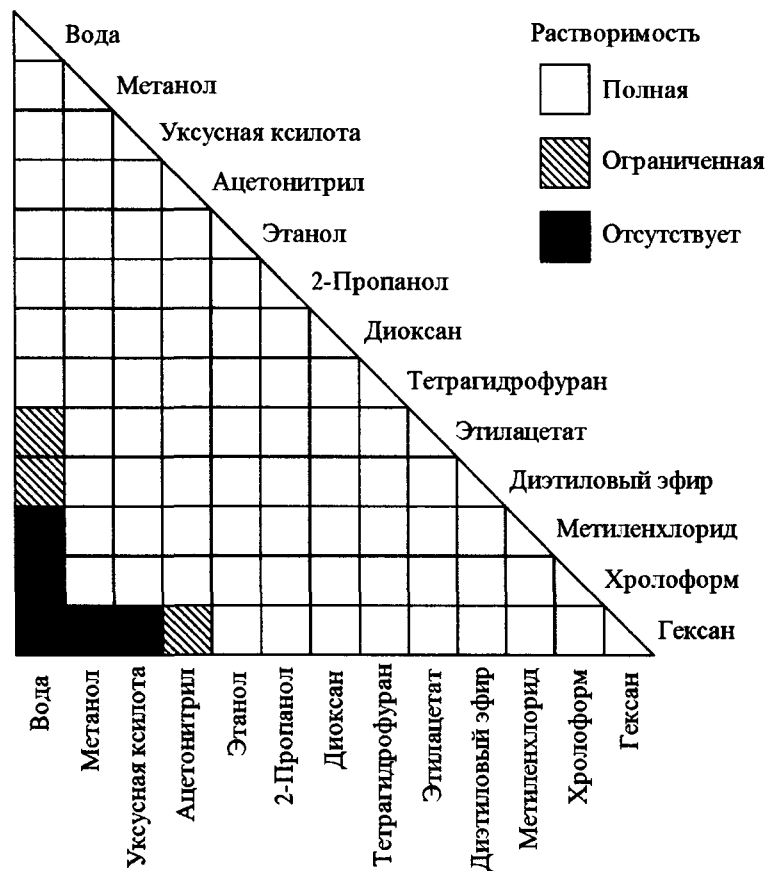


Рис. 5.2. Взаимная совместимость часто применяемых в жидкостной хроматографии растворителей

Таблица 5.12. Эмпирическая миксотропная серия растворителей и критерии гидрофобности

Растворители	$\log P_{\text{эксп}}$	$\log P$	$C\log P$	H
Вода			-1.38	-4
Молочная кислота	-0.72	-0.67	-0.79	-2.7
Формамид	-1.51	-1.07	-1.51	-3
Морфолин	-0.86	-0.87	-0.41	-1.7
Муравьиная кислота	-0.54	-0.42	-0.54	-3
Ацетонитрил	-0.34	0.17	-0.39	-2
Метанол	-0.65	-0.27	-0.87	-3
Уксусная кислота	-0.21	-0.31	-0.19	-2
Этанол	-0.3	0.07	-0.24	-2
Пропан-2-ол	0.05	0.38	0.07	-1
Ацетон	-0.24	0.2	-0.21	-1
Пропан-1-ол	0.28	0.55	0.29	-1
1,4-Диоксан	-0.42	-0.31	-0.39	-1.7
Пропионовая кислота	0.32	0.35	0.34	-1
Тетрагидрофуран	0.46	0.4	0.53	0
Трет-Бутанол	0.36	0.6	0.47	0
Изомасляная кислота		0.91	0.64	0
Бутан-2-ол	0.61	0.87	0.6	0
2-Бутанон	0.29	0.86	0.32	0
Циклогексанон	0.81	1.43	0.87	2
Фенол	1.37	1.64	1.48	2
трет-Амиловый спирт	0.89	1.09	1	1
Бутан-1-ол	0.99	0.97	0.82	0
м-Крезол	1.94	2	1.97	3
Циклогексанол	1.23	1.27	1.16	2
Изоамиловый спирт	1.16	1.3	1.22	1
Амиловый спирт	1.48	1.39	1.35	1
Бензиловый спирт	1.1	1.02	0.9	3
Этилацетат	0.73	0.29	0.71	0
Гексан-1-ол	2.03	1.8	1.88	2
симм-Коллидин	1.88	1.94	2.14	3
Пentanовая кислота	1.39	1.18	1.39	1
Этилформиат		0.18	0.27	-1

Растворители	$\log P_{\text{эксп}}$	$\log P$	$C\log P$	H
Изовалериановая кислота		1.09	1.26	2
Фуран	1.34	1.34	1.32	0
Диэтиловый эфир	0.89	0.76	0.87	0
Октан-1-ол	2.97	2.64	2.94	4
Диэтоксиметан	0.84	0.89	0.62	-0.7
Гексановая кислота	1.88	1.91	1.92	2
Бутилацетат	1.82	1.2	1.77	2
Диизопропоксиметан		1.52	1.24	1.3
Нитрометан	-0.35		-0.28	-3
Диизопропиловый эфир	1.52	1.4	1.49	2
Бутилбутират		2.27	2.83	4
Г-Бромпропан	2.1	1.9	2.13	4
Дибутиловый эфир	3.21	2.57	2.99	4
Хлористый метилен	1.15	1.01	1.25	3
Хлороформ	1.94	1.67	1.95	4
Диизоамиловый эфир		3.25	3.78	6
1,2-Дихлорэтан	1.48	1.66	1.46	4
Бромбензол	2.99	2.86	3.01	7
1,1,2-Трихлорэтан	1.89	1.89	2.05	5
1,2-Дибромэтан	1.96	1.9	1.74	4
Бромэтан		1.41	1.61	3
Бензол	2.13	2.03	2.14	6
Хлористый пропилен	2.04	1.78	1.99	4
Трихлорэтилен	2.29	2.19	2.63	5
Толуол	2.69	2.52	2.64	7
пара-Ксилол	3.18	3.01	3.14	8
Тетрахлорметан	2.83	2.86	2.88	5
Сероуглерод		0.62	1.94	1
Декалин		3.5	4.79	10
Циклопентан	2.64	2.82	2.8	5
Циклогексан	3.44	2.5	3.35	6
Гексан	3.9	3	3.87	6
Гептан	4.66	3.42	4.4	7

Растворители	$\log P_{\text{эксп}}$	$\log P$	$C\log P$	H
Керосин		≈6	≈7	≈12
Петролейный эфир		≈3	≈4	≈6
Парафиновое масло		≈11	≈14	≈26

падение осадка. В табл. 5.13 приведены данные о растворимости некоторых хроматографических реагентов в ряде растворителей.

Не следует путать термины *смешиваемость* и *растворимость*. *Смешивающимися* принято называть два компонента, которые могут быть смешаны друг с другом в любой пропорции, не формируя две отдельные фазы. Если компоненты расслаиваются, образуя межфазную границу, их называют *несмешивающимися*. Под *растворимостью* компонента *A* понимают его способность образовывать до определенной концентрации истинные растворы в растворителе *B*. Предельно концентрированные (насыщенные) растворы могут содержать и много, и мало растворенного вещества, так как растворимость различных веществ в растворителях изменяется в широких пределах.

К диаграмме на рис. 5.2. также не следует относиться как к абсолютному правилу. Если в диаграмме указано, что для пары растворителей взаимная растворимость отсутствует, это означает только то, что эти два компонента формируют две отдельные фазы (расслаиваются) при добавлении одного растворителя к другому в количестве 0.01-1%.

Если они смешиваются в некоторых более сопоставимых пропорциях (1-50%), следует иметь в виду их ограниченную растворимость, но это не подразумевает, что компоненты не совместимы до такой степени, что непригодны для формирования смешанных подвижных фаз. Например, дихлорметан и вода расслаиваются в самом широком диапазоне массовых соотношений, т.е. практически не смешиваются друг с другом. Однако дихлорметан растворим в воде на уровне 2%, а вода растворима в дихлорметане на уровне 0.2 %. Насыщенный раствор воды в дихлорметане будет иметь существенную элюирующую силу в условиях НФХ.

При градиентном элюировании обычно ограничиваются применением растворителей, полностью смешивающихся с водой. С другой

Таблица 5.13. Растворимость тетраалкиламмониевых солей при 20°C в г на 100 мл растворителя.

Растворитель	1*	2	3	4	5	6	7
Ацетон	0	0	6.1	47.9	76.0	17.2	34.8
Ацетонитрил	8.0	7.9	37.0	45.9	∞	46.5	∞
1-Бутанол	22.7	1.7	0.1	54.1	∞	40.8	∞
<i>трет</i> -Бутанол	0	0	0	0	82.0	0	>100
Тетрахлорметан	0	0	0	59.0	>100	0	0
Хлороформ	28.7	0	0	60.6	49.0	>100	∞
Циклогексан	0	0	0	0	0	0	0
1,2-дихлорбензол	0	0	0	48.2	∞	5.6	>100
Е-1,2-дихлор-этилен	0	0	0	47.6	0	0	0
Диэтилдигликоль	0	0	0	10.2	0.2	0	0
Диэтиловый эфир	0	0	0	0	0	0	0
ДМФА	5.0	5.4	30	46.2	53.0	39.4	>100
ДМСО	20.0	33.0	37.4	43.3	>100	53.9	>100
Диоксан	0	0	0	37.0	16.0	1.3	0
Этанол	39.2	21.7	0	51.2	∞	51.7	∞
Этилацетат	0	0	0	47.3	4.0	0	0
1,2-Дихлорэтан	0	0	0	50.0	∞	43.6	∞
2-Бутанон	0	0	0	48.0	>100	7.3	18.8
Триамид							
гексаметилфосфорной кислоты	0.6	0.5	0	36.7	∞	15.9	36.7
Гексан	0	0	0	0	0	0	0
2-Метил-1-пропанол	20	1.7	0	43.3	∞	42.7	∞
4-метил-2-пентанол	0	0	0	46.9	>100	0.7	0
Пропан-2-ол	15.9	1.5	1.0	44.0	∞	24.0	∞
Метанол	>100	>100	6.8	46.2	∞	∞	∞
Метиленхлорид	14.0	0	0	49.9	∞	∞	∞
Нитрометан	18.3	28.8	45.0	47.3	∞	49.4	∞
Пропиленкарбонат	7.6	13.2	24.0	46.5	>100	35.8	∞
Пиридин	0.4	1.0	8.6	48.6	>100	49.0	>100
Сульфолан	10.0	7.8	20.0	46.9	2.0	36.0	30.6
ТГФ	0	0	0	52.9	25.0	0	0.7
Толуол	0	0	0	19.4	0.3	0	0
Вода	∞	∞	26.3	>100	>100	0	∞

Примечание: 1 – тетраэтиламмония бромид; 2 – тетраэтиламмония гидросульфат; 3 – тетраэтиламмония тетрафторборат; 4 – тетрабутиламмония хлорид; 5 – тетрабутиламмония бромид; 6 – тетрабутиламмония иодид; 7 – тетрабутиламмония гидросульфат; 8 – тетрабутиламмония тетрафторборат.

стороны, целый ряд растворителей с ограниченной растворимостью в воде, имеют такую растворимость в ней, которая может быть безусловно полезной в ЖХ: 2-бутанон – 27 %; этилацетат – 8 %; 1-бутанол – 8 %; диэтиловый эфир – 7 %; и т.д. Тройные не расслаивающиеся смеси растворителей могут быть получены при добавлении к двум несмешивающимся растворителям третьего, который хорошо растворим в первых двух. Например, гексан и вода не смешиваются, но добавка к этой паре растворителей пропан-2-ла позволяет в конечном итоге получить единую тернарную подвижную фазу. Это дает хроматографисту важную дополнительную степень гибкости в выборе многокомпонентных подвижных фаз.

Растворимость сильно зависит от температуры. Если процесс смешивания является экзотермическим, это может привести к случаю, когда, казалось бы, гомогенная смесь растворителей после охлаждения до комнатной температуры может стать двухфазной. Этой ситуации можно избежать, если подвижная фаза готовится последовательным смешиванием точно отмеренных объемов каждого компонента элюента, взятых в пропорциях ниже предела растворимости. Температурные эффекты могут быть нивелированы, если хроматографическая система элюент – колонка термостатирована при температуре, исключающей возможность расслоения подвижной фазы. При хроматографировании в условиях комнатной температуры следует использовать смеси, растворимость компонентов в которых по крайней мере на 1 % ниже предела растворимости. Только тогда можно быть уверенным в гомогенности элюента.

В ОФХ часто используют буферные растворы. Следовательно, знание растворимости каждого буферного компонента в подвижной фазе является критическим требованием. Наиболее часто применяют фосфатный буфер в сочетании с водно-ацетонитрильным элюентом. Фосфатные буферные растворы имеет незначительное поглощение в УФ-свете, а также три эффективных буферных области при pH близких к 2, 7 и 12. Эти свойства делают их очень привлекательными для разделения многих сорбатов.

Как уже говорилось, ацетонитрил чаще всего используется в ОФХ для приготовления элюентов. Стандартная подготовка подвижной

фазы заключается в приготовлении буферного раствора, фильтрации и смешивании водного фосфатного буфера с ацетонитрилом.

Рассмотрим для иллюстрации вышесказанного специально подобранный случай. При эквимолярном соотношении (примерном равенстве объемов) ацетонитрила и фосфатного буферного раствора с молярностью около 50 мМ (оптимальная концентрация для буферного действия) образуется осадок. Наиболее критический аспект этого явления заключается в том, что формирование осадка происходит не мгновенно, а постепенно. По существу, данная система пригодна для проведения перекристаллизации и медленного формирования кристаллов. Неприятные последствия выясняются *апостериори*, после того, как подвижная фаза уже была использована. Тонкий слой белого осадка выпадает на дне резервуара для подвижной фазы на внутренних поверхностях всего хроматографического тракта, что приводит к увеличению рабочего давления, истиранию поршня насоса, засоряются фильтры колонки и поры сорбента. Образовавшийся осадок очень трудно удалить из хроматографической системы. Для ее очистки нужна подвижная фаза с составом, идентичным исходной, за исключением буфера. Ее при малом расходе подают через систему, пока не будет достигнуто равновесие. Затем подают растворитель, в котором буфер растворим лучше, и проводят промывку на медленной объемной скорости потока в течение нескольких часов. К сожалению, первоначальная эффективность колонки никогда не восстанавливается полностью.

Ситуация усложняется при градиентном элюировании, если растворители *A* и *B* представляют собой различные буферные составы. Осаждение или расслоение подвижной фазы может происходить в процессе формирования градиента. Если какой-либо из компонентов подвижной фазы достигнет концентрации, превышающей его предельную растворимость, в смесителе или в колонке произойдет или осаждение или расслоение. Чтобы избежать проблем, связанных с растворимостью, рекомендуется готовить подвижные фазы заранее, по крайней мере, за день до использования. За это время в элюент “состарится”, установится равновесие и выпадение осадка или расслоение может быть легко замечено до его использования. Отсутствие опалесценции и осадка в многокомпонентном элюенте стадии – убедительный признак, что смесь пригодна для хроматографии.

5.6. Очистка растворителей

Под очисткой растворителя понимают целый ряд процедур подготовки его к хроматографии для повышения надежности работы хроматографа и обеспечения приемлемых условий детектирования. Требования, предъявляемые к степени чистоты растворителя, с практической точки зрения, можно сформулировать цитатой классика в вопросах свойств растворителей Дж. Риддика: “Материал считается достаточно чистым, если он не содержит примесей такой природы и в таких количествах, которые могли бы препятствовать его использованию в целях, для которых он предназначен”. При очистке растворителей следует помнить, что не допустимо применять металлический натрий или гидриды металлов для высушивания кислород- или галогенсодержащих углеводородов. Не следует применять энергичных осушителей до предварительной грубой сушки с помощью обычных осушителей, перед перегонкой и высушиванием простых эфиров и других растворителей обязателен контроль на наличие пероксидов. Нельзя забывать, что органические растворители за редким исключением токсичны и легко воспламеняются.

Фильтрация растворителей. Для стабильной работы хроматографического тракта необходимо избавляться от механических примесей путем предварительного фильтрования растворителей, помещаемых в резервуар хроматографа, через материалы с размером пор 2-5 мкм. В каждом хроматографическом приборе всасывающая линия снабжена фильтром. Для нормальной работы насосов необходимо, чтобы сопротивление этой линии было минимальным, в противном случае при всасывании возможно образование паровых пузырей и нарушение работы клапанов. Поэтому поверхность используемых фильтров довольно большая. Для улучшения работы насоса иногда рекомендуют размещать резервуары с подвижной фазой на несколько десятков сантиметров выше насоса. С течением времени фильтры засоряются, их сопротивление увеличивается, возрастает вероятность нарушений работы насоса. Оценить состояние всасывающего фильтра хроматографа можно следующим образом. К выходу насоса присоединяют отрезок капилляра длиной 50 см и внутренним диаметром 0.25-0.5 мм. Конец капилляра размещают на 50 см

ниже уровня подвижной фазы в резервуарах. Засасывают с помощью шприца в капилляр жидкость из резервуара. После отсоединения шприца при остановленном насосе подвижная фаза должна продолжать самопроизвольно вытекать из капилляра со скоростью не менее 0.5 мл/мин. Меньшая скорость свидетельствует о засорении фильтра. Для его очистки можно рекомендовать следующую процедуру. Фильтр отсоединяют от системы и продувают сжатым воздухом в направлении, противоположном рабочему. Затем помещают в стакан, заливают ацетоном и устанавливают стакан в ультразвуковую ванну. Через 10 мин ацетон заменяют дистиллированной водой, затем 30%-ной азотной кислотой. После 10-минутной выдержки в ультразвуковой ванне фильтр отмывают от азотной кислоты дистиллированной водой до pH 5. После этого он готов к использованию в водных растворителях. Для работы с органическими подвижными фазами продолжают промывку: два раза ацетоном или спиртом, затем два раза подвижной фазой.

Деаэрация. Чтобы избежать спонтанной деаэрации растворителя, особенно в области впускного клапана насоса, а также уменьшить шумы детектора, возникающие из-за образования газовых пузырьков в оптической ячейке, из растворителей должны быть удалены газы воздуха. Особенно деаэрация необходима при работе с водными элюентами. Для деаэрации через барботер в резервуар емкостью 1 л с растворителем в течение 10 мин нагнетается гелий со скоростью 100 мл/мин, после чего скорость продувки можно уменьшить до 10 мл/мин. Растворимость гелия в жидкостях не велика, при барботаже он увлекает с собой растворенные газы. При отсутствии гелия возможна продувка азотом: она менее эффективна. Однако при насыщении азотом из растворителя удаляется наиболее нежелательный компонент – растворенный кислород, который является главной причиной образования газовых пузырьков в оптической ячейке. Насыщение элюента инертным газом рационально, даже если образование пузырьков не мешает определению, потому что растворенный кислород может реагировать и с подвижной, и неподвижной фазой, а также с сорбатом.

Если используются насосы и детектирующие системы с повышенной чувствительностью к пузырькам воздуха, предпочтитель-

ным может оказаться деаэрирование путем нагрева и (или) вакуумирования. Растворитель вакуумируют 5 мин при вакууме примерно 50 мм рт. ст. в толстостенном сосуде с растворителем, помещенном на электронагревательном приборе с магнитной мешалкой. Легкий нагрев и перемешивание растворителя повышают эффективность дегазации, которую проводят до прекращения видимого выделения пузырьков. Если органические растворители можно вакуумировать, не подогревая, то для водных растворов, в которых кислород хорошо растворим, желателен дополнительный нагрев.

Для дегазации может быть использована обработка ультразвуком. Для этих целей сосуд с растворителем помещается на 5-10 мин в ультразвуковую ванну, заполненную водой. Процесс протекает эффективней, если резервуар с растворителем подключить к вакуумной установке.

Очистка от химических примесей. Как известно, реактивы классифицируют по степени чистоты на “чистые”, “чистые для анализа”, “химически чистые”, “особо чистые” в зависимости от содержания примесей. Абсолютно чистых веществ в природе не бывает. Предполагается, что специалист хроматографической лаборатории использует для очистки растворители с определенной стандартной степенью чистоты, а не технические растворители, применение которых в ЖХ не целесообразно. Растворитель должен быть такой степени чистоты, которая достаточна для уверенного детектирования на том или ином типе детектора. Одни и те же примеси в разных условиях могут либо вообще не влиять на результат, либо сделать анализ невозможным. Например, если примеси поглощают в УФ свете, необходимо обязательно их удалять, если применяется УФ детектор. Так, незначительная примесь алкенов в алкановом растворителе (гексане, гептане или изеооктане) совершенно не мешает при работе с рефрактометром, но практически не позволяет проводить детектирование УФ-детектором при длине волны менее 260 нм. Напротив, даже заметная добавка гептана к гексану не окажет никакого влияния на сигнал УФ-детектора, но исказит количественные данные рефрактометра. Требования к чистоте растворителя при градиентном элюировании значительно выше, чем при изократическом. В процессе градиентного элюирования примеси, содержащиеся в растворителях, концентрируются в начале ко-

лонки и вымываются из нее по мере возрастания элюирующей силы подвижной фазы. При этом наблюдается сильный дрейф нулевой линии, а некоторые примеси элюируются узкими зонами и регистрируются детектором в виде самостоятельных пиков. В изократическом режиме примеси в начале эксперимента также могут концентрироваться на сорбенте, но в системе достаточно быстро устанавливается динамическое равновесие, и нулевая линия выравнивается на каком-то определенном уровне сигнала детектора. Этот сигнал во многих случаях можно скомпенсировать электротехническим вычитанием фона, но при этом соответственно уменьшается линейный динамический диапазон детектора. В адсорбционной хроматографии особое значение имеет тщательная осушка растворителей, так как даже небольшое изменение содержания воды в подвижной фазе может заметно изменить фактор удерживания и степень разделения компонентов. При электрохимическом детектировании важное значение может иметь степень деионизации воды. Растворители для ВЭЖХ, как правило, очищают от примесей поглощающих в УФ-свете. Они выпускаются с маркировкой "для ВЭЖХ". В сертификате или на этикетке указывают предел пропускания в УФ-области и содержание воды. Для хроматографиста ставится задача разумного компромисса между стоимостью растворителя и его степенью чистоты, между затратами на самостоятельную дополнительную очистку или затратами на приобретение реактива соответствующей квалификации. С другой стороны, в процессе хранения или повторной эксплуатации растворителя также возникает необходимость его очистки в лаборатории.

Основными методами очистки растворителей являются перегонка и адсорбционное отделение примесей. Часто для достижения требуемой чистоты достаточно простой перегонки. Однако и в тех случаях, когда необходима адсорбционная очистка, целесообразно сначала высушить и перегнать растворитель. При этом на том же количестве адсорбента можно получить заметно больше очищенного продукта. Общей проблемой для всех растворителей является удаление влаги. Многие растворители образуют с водой азеотропные смеси, что позволяет отделить основное количество воды отгонкой смеси. Для полного удаления влаги используют молекулярные сита – цеолиты типа NaA (4A) или KA (3A), которые предварительно активируют прокаливанием в муфельной печи при 420-450 °С.

Адсорбционную очистку проводят методом классической колоночной хроматографии. В качестве адсорбентов используют оксид алюминия и силикагель с большой удельной поверхностью (например, KCM-5) и размером зерна 0.1-0.5 мм. Сорбенты предварительно сушат в течение нескольких часов соответственно при 250-300 °С и 160-180 °С. Обычно применяют стеклянные колонки достаточно большой вместимости с отношением высоты к диаметру в пределах 20-30 и краном, работающим без смазки. Наилучшие результаты достигаются на колонках с двумя слоями сорбента: нижнюю половину колонки набивают оксидом алюминия, а верхнюю – силикагелем. На колонке, содержащей по 100 г этих адсорбентов, в зависимости от их активности и содержания примесей можно очистить 300-600 мл неполярных растворителей и в полтора – два раза меньше малополярных растворителей типа хлороформа или тетрагидрофурана.

Качество очистки обычно контролируют по пропусканию в УФ-области.

Как правило, первая порция (20-50 мл) растворителя имеет недостаточную чистоту, и ее возвращают в верхнюю часть колонки. Более полярные растворители, расположенные в элюотропных рядах ниже этилацетата, данным методом очищать нельзя. Очищенные растворители хранят в тщательно закрытых толстостенных бутылках из темного стекла, в которые добавляют 10-20 г активного цеолита. Из бутылей с растворителями, склонными к окислению, целесообразно перед закрыванием удалить воздух продувкой сухим аргоном или азотом. Тщательная очистка растворителей – достаточно сложный и трудоемкий процесс, и ее следует проводить только в той степени, в которой это действительно необходимо. Ниже приведены методики очистки растворителей с учетом специфики их применения в жидкостной хроматографии.

5.6.1. Углеводороды

Насыщенные углеводороды. Предельные углеводороды такие, как пентан, гексан, гептан, изооктан, циклопентан, циклогексан, их изомеры и смеси (петролейные эфиры), могут содержать примеси алкенов и (или) ароматических соединений и, кроме того, соединений

серы. Очистку углеводородов проводят следующим образом. Растворитель встряхивают со смесью концентрированных серной и азотной кислот, повторяя эту операцию два-три раза; если с помощью перманганата калия в растворителе обнаружены примеси алкенов, его обрабатывают концентрированным раствором KMnO_4 в 10%-ной H_2SO_4 до тех пор, пока перманганат не покажет отрицательную реакцию на двойные связи. Растворитель тщательно промывают водой, высушивают над хлористым кальцием и перегоняют. Примеси любых ненасыщенных соединений удаляют, пропуская растворитель через колонку, заполненную активированным оксидом алюминия. Следует заметить, что этим методом нельзя разделить изомеры с близкими температурами кипения. Различные петролейные эфиры (низкокипящие, высококипящие и др.) довольно часто используются в качестве растворителей для подготовки пробы и элюентов для хроматографии. Растворители, используемые таким образом, рекомендуются хранить над высушивающим агентом (например, сульфатом кальция) и один раз перегонять перед употреблением; низкокипящие петролейные эфиры часто содержат высококипящие "примеси", которые могут загрязнять хроматографические фракции.

Алканы очищают от непредельных соединений обработкой смесью концентрированных серной и азотной кислот с последующей отмывкой дистиллированной водой до нейтральной реакции и осушкой. Высушенные растворители перегоняют. Описан также метод удаления алкенов колоночной хроматографией на силикагеле, пропитанном нитратом серебра. Сорбент готовят следующим образом: на высушенный силикагель с размером зерен 100-300 мкм наносят нитрат серебра из 10%-ного водного раствора (аналогично нанесению неподвижной жидкой фазы в газовой хроматографии) и сушат при 125 °C [57].

Для сушки алканов эффективными осушителями являются пентаоксид фосфора и металлический натрий.

Гексан от ненасыщенных углеводородов очищают описанным выше способом, условия его хранения такие же, как и для петролейного эфира. Так, фракция петролейного эфира, кипящая при 60-70 °C, состоит в основном из гексана. Гексан можно оставить под натрием на 24 ч, а затем перегнать. Дистиллят несколько раз нагреть с концентрированной серной кислотой, промыть водным раствором карбоната натрия, высушить и еще раз перегнать [367].

Гептан и изооктан (2,2,4-триметилпентан) очищают по общей схеме для алканов – освобождаются от алкенов, сушат и перегоняют.

Петролейный эфир. Выпускаются различные фракции этого растворителя: с температурой кипения 30-50, 40-70 и 70-100 °C. В жидкостной хроматографии чаще используют фракцию петролейного эфира 40-70 °C, не содержащую алкенов и аренов. Непредельные углеводороды можно обнаружить по обесцвечиванию разбавленного 2%-го водного раствора перманганата калия (KMnO_4). Для этого в пробирку вносят одну каплю раствора KMnO_4 и разбавляют водой до получения светло-розового раствора. Переносят 2 мл этого раствора в другую пробирку, прибавляют одну каплю петролейного эфира и встряхивают в течение 10-20 с. Обесцвечивание раствора в течение 1 мин указывает на наличие ненасыщенных углеводородов. Ненасыщенные углеводороды из петролейного эфира удаляют следующим образом. К 8-10 объемам эфира в делительную воронку приливают один объем концентрированной серной кислоты (х.ч.) и взбалтывают 10-15 мин. Побуревшую кислоту сливают, приливают новую порцию и очистку продолжают. Обработку эфира серной кислотой повторяют до тех пор, пока не прекратится побурение кислоты. Далее эфир промывают 1-2 раза дистиллированной водой, затем 15-16%-ым раствором гидроксида натрия (его берут в таком же объеме, как и серную кислоту) и вновь водой 4-5 раз до исчезновения реакции на щелочь в промывных водах (определяют по фенолфталеину). Эфир сушат безводным сульфатом натрия и перегоняют при температуре 40-70 °C на водяной бане с закрытым электронагревателем. Первые и последние порции петролейного эфира выбрасывают. Хранят эфир над безводным сульфатом натрия в темной посуде или в темном месте без доступа влаги.

Циклогексан, получаемый гидратацией бензола, в качестве примеси его и содержит. Если в циклогексане большое содержание бензола, необходима химическая очистка. Циклогексан обрабатывают нитрующей смесью, в которой он практически не растворим, а образующийся нитробензол в ней растворим заметно сильнее. После промывки дистиллированной водой циклогексан подвергают фракционной перегонке над натрием.

Ароматические и ненасыщенные углеводороды используются, главным образом, в планарной хроматографии, для которой не

имеет особой роли УФ-поглощающие или флуоресцирующие примеси. Арены можно сушить над CaCl_2 . Как правило, достаточно простой перегонки.

Бензол встряхивают или перемешивают с концентрированной серной кислотой (100 мл на 1 л бензола) и затем удаляют слой кислоты. Процедуру повторяют до тех пор, пока слой кислоты не будет иметь очень слабую окраску. Бензол декантируют и перегоняют. Таким образом удаляются примеси тиофена, алкенов и воды.

Кумол (изопропилбензол) пятикратно промывают концентрированной серной кислотой (10:1), затем водой, раствором карбоната натрия, снова водой с последующей осушкой над безводным сульфатом магния и перегонкой над натрием.

Толуол (метилбензол) и **ксилолы** (диметилбензолы) очищают таким же образом. Следует только выдерживать температуру ниже 30°C , чтобы исключить реакцию сульфирования. *Пара*-Ксилол содержит, как правило, примесь *мета*-ксилола, которая мало влияет на применение растворителя в хроматографических методиках.

Циклогексен очищают от циклогексанола фракционной перегонкой, кипячением с обратным холодильником в течение 7 ч над натрием, повторной перегонкой.

Этилбензол очищают по той же методике, что и бензол. В качестве осушителя этилбензола хорошо себя зарекомендовал мелкоизмельченный силикагель.

5.6.2. Галогенпроизводные углеводородов

Галогенпроизводные углеводородов часто содержат микропримеси хлороводородной кислоты, образующейся при их хранении, под действием которой сильно корродируют металлические детали и разрушаются адсорбенты. Кислоту удаляют адсорбционной очисткой на щелочном оксиде алюминия. Среди хлорсодержащих растворителей особой химической лабильностью отличается хлороформ, который легко разлагается под действием света с образованием фосгена. Для замедления этой реакции хлороформ стабилизируют добавкой 0.5 -1% этилового спирта. Общим правилом при работе с хлорсодержащими углеводородами является использова-

ние только свежеперегнанных растворителей. Их смеси с другими растворителями также готовят в расчете на суточную потребность.

Бромэтан (этилбромид, бромистый этил) несколько раз промывают холодной серной кислотой, затем водой, сушат над хлористым кальцием и перегоняют. Основными примесями бромэтана является этиловый спирт и вода.

Бромформ (трибромметан) по устойчивости в хранении и реакционной способности напоминает хлороформ. Растворитель несколько раз промывают концентрированной серной кислотой, разбавленным раствором гидроксида натрия и водой, сушат над безводным поташом и перегоняют при пониженном давлении.

1,2-Дихлорбензол (*о*-дихлорбензол) сушат над хлоридом кальция и перегоняют.

1,2-Дихлорэтан. Для удаления примесей кислот (в особенности HCl , образующейся при стоянии растворителя на свету) дихлорэтан встряхивают с основным оксидом алюминия (1 г/л) или выдерживают над NaOH . Сухой растворитель получают перегонкой над P_2O_5 .

Метиленхлорид (хлористый метилен, дихлорметан) промывают концентрированной серной кислотой, затем водным раствором карбоната натрия и водой, после чего сушат над хлористым кальцием. После перегонки над P_2O_5 получают чистый и сухой метиленхлорид.

1,1,2,2-Тетрахлорэтан промывают концентрированной серной кислотой, перегоняют с водяным паром, сушат над карбонатом кальция, затем подвергают фракционной перегонке.

Тетрахлорэтилен реагирует с концентрированными серной и азотной кислотами, при хранении окисляется до фосгена и трихлоруксусной кислоты, поэтому в продажный растворитель могут добавлять в качестве стабилизаторов этиловый спирт и тимол (до 0.0005%). Растворитель сушат над сульфатом натрия и хлоридом кальция и перегоняют.

Хлорбензол несколько раз промывают свежими порциями серной кислоты до прекращения окрашивания последней, затем промывают водой и разбавленным раствором бикарбоната калия, осушают над хлоридом кальция и перегоняют. Как правило, стадию химической очистки можно опустить, достаточно высушить хлорбензол над хлоридом кальция или пентаоксидом фосфора и перегнать.

1-хлорбутан (хлористый бутил, бутилхлорид) кипятят с обратным холодильником вместе с концентрированной серной кислотой, несколько раз промывают водой, сушат последовательно над двумя порциями хлорида кальция и перегоняют [363].

2-Хлорпропан (хлористый изопропил, изопропилхлорид) сушат над P_2O_5 и фракционируют над небольшим количеством безводного карбоната натрия [363].

Хлороформ (трихлорметан). Поступающий в продажу хлороформ чаще всего содержит около 1% этанола в качестве стабилизатора, предохраняющего хлороформ от окисления кислородом воздуха в фосген. Для очистки растворителя рекомендуется один из следующих методов:

а) Хлороформ встряхивают с концентрированной H_2SO_4 , промывают водой, сушат над $CaCl_2$ или $KaCO_3$ и перегоняют.

б) Хлороформ пропускают через колонку, заполненную активированным оксидом алюминия (степень активности I) (около 25 г на 500 мл $CHCl_3$).

в) Хлороформ несколько раз встряхивают с водой (около половины объема растворителя), сушат над $CaCl_2$ и перегоняют над P_2O_5 .

г) Для удаления из хлороформа примесей HCl , этилового спирта и фосгена продажный хлороформ можно промыть 5-6 раз дистиллированной водой в соотношении 2:1, высушить над безводным сульфатом натрия.

Высушенный хлороформ, очищенный по любому из этих методов, перегоняют при температуре $70^\circ C$ и хранят над безводным сульфатом натрия в темной посуде с притёртой пробкой, в темноте, в атмосфере N_2 , чтобы предотвратить образование фосгена.

Перегнаный хлороформ можно хранить с 5-10 об. % активного цеолита CaA (5A). Непосредственно перед употреблением растворитель еще раз перегоняют.

Четыреххлористый углерод. Примеси CS_2 из CCl_4 удаляют перемешиванием горячего растворителя с 10 об. % концентрированного спиртового раствора КОН. Эту процедуру повторяют несколько раз, после чего растворитель промывают водой, высушивают над $CaCl_2$ и перегоняют над P_2O_5 .

5.6.3. Спирты

Спирты достаточно высоких квалификаций, имеющиеся в продаже, как правило, могут использоваться без дополнительной очистки. При их использовании в режиме адсорбционной ЖХ необходимо контролировать их влажность и при необходимости обезвоживать.

Амиловый спирт (*n*-пентанол, пентан-1-ол, амилол, пентильовый спирт) осушают драйеритом и перегоняют.

Бензиловый спирт (фенилметанол) тщательно перегоняют при пониженном давлении и отсутствии воздуха.

Бутан-1-ол (бутиловый спирт, *n*-бутанол) Спирт в количестве 1600 г помещают в одногорлую колбу, снабженную обратным холодильником, и кипятят над свежееобожженной известью (50 г) в течение 4 ч и перегоняют.

Бутан-2-ол (*втор*-бутиловый спирт) очищают так же, как 1-бутанол.

Изоамиловый спирт (изопентанол, 3-метил-1-бутанол, изоамилол) кипятят с концентрированным раствором гидроксида калия, промывают разбавленным раствором фосфорной кислоты, сушат сначала над поташом, а затем над безводным сульфатом меди и перегоняют [363].

Изобутиловый спирт (изобутанол, 2-метил-1-пропанол) кипятят с известью в течение 5 ч, затем 1.5 ч с кальциевыми стружками, после чего перегоняют.

***трет*-Бутиловый спирт** (*трет*-бутанол, 2-метил-2-пропанол) Для получения спирта очень высокой чистоты (т. пл. $25.4^\circ C$) его перегоняют над CaO с последующей многократной кристаллизацией.

Гексан-1-ол (*n*-гексанол, гексиловый спирт) и **октан-1-ол** (*n*-октанол, октиловый спирт) содержат другие спирты в виде примесей. Их можно осушать драйеритом, после чего подвергать перегонке.

Глицерин (глицерол, 1,2,3-пропантриол) перегоняют под вакуумом.

Метанол (древесный спирт, метиловый спирт) Наиболее трудно отделяемой примесью в метаноле является ацетон, который лучше всего удалять обработкой гипоиодитом натрия $NaOI$. Раствор 25 г иода в 1 л метанола медленно вливают при перемешивании в 500 мл 1 М раствора $NaOH$ и добавляют 150 мл воды. Через 6-10 ч отфильтровывают образовавшийся йодоформ и кипятят фильтрат с

обратным холодильником до исчезновения запаха йодоформа. Большинство примесей, в том числе и основную массу воды, удаляют перегонкой. Для получения очень сухого продукта его выдерживают над цеолитами NaA или KA.

В метаноле, помимо воды, обнаруживаются примеси карбонильных и гидроксилсодержащих соединений с числом атомов C от 1 до 4, однако растворитель со степенью чистоты “химически чистый” обычно содержит лишь следы таких примесей. В качестве высушивающего агента для метанола *не рекомендуется* использовать CaSO_4 (поступающий в продажу под названием “драйерит” с цветным индикатором или без него). Безводный CaSO_4 с индикатором CoCl_2 имеет голубую окраску, когда осушитель поглощает воду, индикатор окрашивается в розовый цвет. Остатки воды можно также удалить с помощью метилата магния следующим образом: смесь 50 мл метанола 5 г Mg в виде стружки и 0.5 г сублимированного иода кипятят с обратным холодильником до обесцвечивания раствора и прекращения выделения водорода. Затем добавляют 1 л метанола, кипятят с обратным холодильником около 30 мин и осторожно перегоняют.

Пропан-1-ол (*n*-пропанол, пропиловый спирт) обычно содержит в виде примеси алиловый спирт, который удаляют добавлением 1,5 мл Br_2 на 1 л спирта; растворитель затем перегоняют над безводным K_2CO_3 . Очень сухой растворитель получают с использованием Mg по методике, описанной для метанола.

Пропан-2-ол (изопропиловый спирт, изопропанол, 2-пропанол) чаще всего используют как модификатор в адсорбционной хроматографии. Поэтому наиболее опасной примесью в нем является вода. 2-пропанол образует с водой азеотропную смесь, кипящую при 80.3 °C и содержащую, по разным данным, 9-12% воды. При небольшой концентрации воды в исходном продукте ее легче всего удалить путем отгонки смеси над гидроксидом натрия или калия. Воду можно удалить также кипячением с обратным холодильником или перегонкой над известью. Если же содержание воды выше 5-6%, то растворитель сначала сушат над безводным сульфатом натрия. Для удаления следов воды 2-пропанол выдерживают над цеолитом NaA. По отношению к дистиллированной воде перегнаный изопропиловый спирт должен иметь оптическую плотность не более 0.1 при 320-390 нм. Растворитель склонен к образо-

ванию пероксидов, которые обычно разрушают кипячением с обратным холодильником над SnCl_2 . Достаточно сухой и чистый растворитель получают перегонкой над безводным сульфатом кальция; очень сухой спирт получают с использованием Mg [135].

Этанол (алкоголь, винный спирт, этиловый спирт). Поступающий в продажу “абсолютный” этанол содержит около 0.1–0.5% воды и, как правило, 0.5–10% денатурирующего агента (ацетона, бензола, диэтилового эфира или метанола и т. д.). Более доступный и менее дорогой растворитель обычно представляет собой азеотропную смесь с водой (4.5%) (95%-ный этанол или спирт-ректификат); (Т кип. 78,2°). Именно этот растворитель чаще всего используется в УФ-спектрофотометрии: не содержит примесей бензола и других денатурирующих агентов. Чистый этанол весьма гигроскопичен и легко поглощает влагу; это обстоятельство следует учитывать при получении сухого растворителя.

Для удаления следов воды из абсолютного этанола рекомендуется следующий метод. Смесь 60 мл абсолютного этанола, 5 г Mg (стружка) и нескольких капель CCl_4 или CHCl_3 (катализатор) кипятят с обратным холодильником до тех пор, пока весь Mg не превратится в этилат. Добавляют еще 900 мл абсолютного этанола, кипятят с обратным холодильником в течение 1 ч и перегоняют. Если необходимо обеспечить отсутствие в абсолютном растворителе соединений галогенов, вместо CHCl_3 или CCl_4 в качестве катализатора можно использовать легколетучий этилбромид. Образование объемного осадка при добавлении в этанол бензольного раствора этилата алюминия позволяет обнаружить присутствие в растворителе до 0.05% воды. Хранение абсолютного этанола над молекулярным ситом 3A позволяет сохранять растворитель с содержанием воды не более 0.005%.

Большую часть воды из 95%-ного спирта удаляют кипячением с обратным холодильником над свежей известью (CaO) и последующей перегонкой. В качестве другого метода рекомендуется азеотропная перегонка: воду отгоняют из тройной азеотропной смеси, например, бензол – этанол – вода (Т кип. 64,48°); затем отгоняют бензол из двойной азеотропной смеси бензол – этанол (Т кип. 68,24°).

Для обезвоживания спирта применяют также безводный сульфат меди из расчета 100 г на 500 мл спирта. После добавления к

спирту сульфата меди колбу несколько раз встряхивают, затем нагревают на водяной бане с обратным холодильником до тех пор, пока соль не приобретет светло-голубой цвет. После этого, отделив соль фильтрованием, спирт отгоняют на водяной бане.

Этиленгликоль (1,2-этандиол) в качестве примесей в основном содержит пропиленгликоль и бутандиол, очень гигроскопичен. Растворитель перегоняют под вакуумом, сушат над сульфатом натрия и повторно перегоняют.

5.6.4. Простые эфиры

Простые эфиры, особенно циклического строения – тетрагидрофуран, диоксан, легко окисляются воздухом с образованием пероксидов. Присутствие последних крайне нежелательно, так как они разрушают сорбенты с привитой фазой и полимерные сорбенты, а также окисляют компоненты анализируемых смесей и поглощают в УФ-области.

Анизол (метоксибензол, метилфениловый эфир) сушат над хлористым кальцием и перегоняют в высоком вакууме, небольшие количества примеси фенола можно удалить встряхиванием с гидроксидом натрия.

Диоксан (1,4-диоксан) может содержать большое количество примесей, поэтому его трудно очистить. Традиционный метод очистки состоит в следующем. Смесь 300 мл воды, 40 мл концентрированной HCl и 3 л диоксана кипятят с обратным холодильником в течение 12 ч в медленном токе азота (для удаления ацетальдегида, который образуется при гидролизе примеси ацетала этиленгликоля). Раствор охлаждают и добавляют гранулы KOH до тех пор, пока они не перестанут растворяться и не произойдет разделение слоев. Слой диоксана (верхний слой) декантируют и сушат над свежей гидроокисью калия. Высушенный диоксан кипятят над Na в течение 12 ч или до тех пор, пока Na не будет сохранять блестящую поверхность. Затем растворитель перегоняют над Na и хранят в темноте в атмосфере N₂.

Для высушивания диоксана не следует использовать LiAlH₄, так как он может разлагаться при температуре кипения растворителя.

Диизопропиловый эфир (изопропиловый эфир, диизопропилоксид) легко образует перекиси, очищать его следует аналогично диэтиловому эфиру.

Диэтиловый эфир (этиловый эфир, диэтилоксид). Во всех случаях, за исключением тех, когда используют готовый “абсолютный” эфир, растворитель следует проверять на присутствие пероксидов и соответствующим образом обрабатывать. При работе с эфиром необходимо соблюдать дополнительные меры предосторожности, связанные с легкой воспламеняемостью растворителя. Достаточно сухой эфир можно получить высушиванием и перегонкой над натриевой проволокой, однако наиболее эффективным методом является перегонка над LiAlH₄ (или CaH₂).

Пероксиды из него удаляют следующим образом: 1 литр эфира встряхивают 5-10 мин в двухлитровой делительной воронке или колбе со смесью 10 мл 40%-го раствора KOH (или NaOH) и 100 мл 4%-го раствора перманганата калия. После отстаивания раствор перманганата сливают и вновь добавляют такое же количество нового раствора перманганата и очистку повторяют. Обработку эфира повторяют до тех пор, пока окраска вновь добавленного раствора перманганата не перестанет изменяться. Однако и после этого необходимо проверить эфир на присутствие пероксидов. Если обнаружится присутствие пероксидов, очистку эфира перманганатом калия необходимо продолжить. При отсутствии пероксидов эфир промывают несколько раз дистиллированной водой до нейтральной реакции промывных вод на фенолфталеин. Очищенный эфир сушат безводным сульфатом натрия и перегоняют при 40 °C на водяной бане с закрытым электрообогревом. Хранят эфир над безводным сульфатом натрия в темной посуде с притертой пробкой и в защищенном от света месте.

Тетрагидрофуран (ТГФ, фуранидин, тетраметиленоксид). Этот растворитель обычно стабилизируют гидрохиноном. Перед перегонкой проверяют наличие в тетрагидрофуране пероксидов. К 1 мл растворителя прибавляют 1 мл 10%-ного раствора KI или NaI в ледяной уксусной кислоте. При низкой концентрации пероксида раствор окрашивается в желтый цвет, а при высокой – в коричневый. Другой способ проверки: пробу эфира (2-3 мл) встряхивают в пробирке с таким же объемом 2%-го раствора иодида калия, предварительно подкисленного несколькими каплями разбавленной соляной кислоты. Появление бурого окрашивания эфирного слоя

указывает на присутствие пероксидов. Или же к 20 мл эфира приливают 5 мл смеси, состоящей из равных объемов 50%-го раствора KI и 1%-го спиртового раствора фенолфталеина. Появление красной окраски указывает на присутствие пероксидов.

При заметном содержании пероксидов во избежание взрыва при перегонке их удаляют кипячением с 0.5% суспензией Cu_2Cl_2 в течение 30 мин. Тетрагидрофуран после удаления пероксидов хранят над твердым КОН (10-15 об. %) в плотно закрытой бутылки из темного стекла в атмосфере инертного газа и перегоняют непосредственно перед применением. Чистота полученного растворителя вполне достаточна для проведения эксклюзионной хроматографии на полужестких полистирольных гелях при детектировании рефрактометром. В других вариантах, особенно при работе с УФ-детектором, может потребоваться дополнительная адсорбционная очистка. В частности, обработка тетрагидрофурана и диизопропилового эфира цеолитами NaX и CoX позволяет удалить до 90-99% пероксидов.

ТГФ после удаления пероксидов можно перегонять над литий-алюминийгидридом или гидридом кальция. Такой метод позволяет получить очень сухой растворитель.

Метил-трет-бутиловый эфир практически не образует пероксидов. Этот растворитель перспективен для применения в препаративной жидкостной хроматографии, так как устраняется опасность загрязнения выделяемых веществ продуктами окисления растворителя.

5.6.5. Сложные эфиры

Сложные эфиры нельзя сушить хлоридом кальция.

Метилацетат (метиловый эфир уксусной кислоты, метилэтанوات) (1 л) кипятят 6 ч с 85 мл уксусного ангидрида, перегоняют. Дистиллят встряхивают с 20 г безводного карбоната калия и вновь перегоняют.

Бутилацетат (бутиловый эфир уксусной кислоты, бутилэтанوات) сушат над безводным сульфатом магния и перегоняют.

Этилацетат (этиловый эфир уксусной кислоты, этилэтанوات). Поступающий в продажу этилацетат чаще всего содержит в качестве примесей воду, этанол и кислоты; их удаляют, промывая ра-

створитель 5%-ным водным раствором карбоната натрия, затем насыщенный раствором хлористого кальция, после чего высушивают над безводным карбонатом калия и перегоняют над P_2O_5 . Следует еще раз подчеркнуть, что при перегонке растворителей, склонных к образованию пероксидов, необходимо тщательно соблюдать технику безопасности. Перегонку следует вести на водяной или силиконовой бане, не допуская перегрева растворителя. В колбу обязательно должны быть внесены свежие инициаторы кипения (лучше всего кусочки стеклянных фильтров или пористого фторопласта); перегонку необходимо прекращать, оставляя в кубе не менее 1/5 объема загрузки. Кубовый остаток можно прибавить к свежей порции растворителя, подготовленной для химического удаления пероксидов.

5.6.6. Кетоны

Кетоны перед перегонкой сушат над безводными поташем, сульфатом натрия или пентаоксидом фосфора.

Ацетон (диметилкетон, пропанон) высушивают над K_2CO_3 , сито 4А и K_2CO_3 . Перегонка над небольшим количеством KMnO_4 позволяет разрушить примеси, содержащиеся в ацетоне, например, альдегиды. Очень чистый ацетон получают следующим образом: насыщают сухим NaI при 25 – 30 °С, раствор декантируют и охлаждают до -10 °С; кристаллы NaI образуют с ацетоном комплекс, который отфильтровывают и нагревают до 30 °С; образующуюся жидкость перегоняют [135].

Наиболее трудно удаляемая примесь в ацетоне – вода. Ацетон можно обработать хлористым кальцием и перегнать. Полученный продукт обработать пентаоксидом фосфора и подвергнуть фракционной перегонке [363].

Бутан-2-он (бутанон, метилэтилкетон) очищают также, как ацетон. Бутан-2-он для удаления кислых примесей несколько раз обрабатывают насыщенным раствором поташа, отделяют слой органического растворителя, перегоняют, сушат несколько дней над сульфатом натрия и безводным поташом, после декантирования перегоняют.

Циклогексанон сушат сутки над безводным сульфатом натрия и перегоняют.

Карбоновые кислоты перед перегонкой сушат над пентаоксидом фосфора (фосфорным ангидридом).

Муравьиная кислота (метановая кислота) доступна в различных концентрациях и с различной степенью чистоты. Реактив марки "чистый для анализа" обычно содержит около 88% кислоты. Чаще всего встречаются препараты с более низким содержанием кислоты, а именно от 25 до 50%.

При комнатной температуре муравьиная кислота медленно разлагается на воду и окись углерода, что препятствует ее применению в качестве растворителя. Муравьиная кислота является гигроскопичной. В качестве осушителей пригодны борная кислота, борный ангидрид и безводный сульфат меди. Для получения борного ангидрида борную кислоту плавят в муфельной печи, выливают на стальную пластину и охлаждают в эксикаторе. P_2O_5 непригодны для этой цели, так как они реагируют с муравьиной кислотой. Получить безводный препарат муравьиной кислоты с помощью дегидратирующих реагентов не удастся, поэтому ее применение в режиме НФХ не целесообразно.

Уксусная кислота (этановая кислота). Поступающая в продажу ледяная уксусная кислота (~99,5%) содержит примеси карбонильных соединений, которые удаляют кипячением с обратным холодильником в присутствии от 2 до 5, масс. % $KMnO_4$ или избытка Cr_2O_3 , после чего кислоту перегоняют. Следы воды удаляют при нагревании обработкой двойным или тройным избытком триацетилбората, который готовят нагреванием при 60°C смеси борной кислоты и уксусного ангидрида (в соотношении 1:5 по массе); смесь уксусной кислоты с триацетилборатом охлаждают и образовавшиеся кристаллы отфильтровывают. После перегонки получают безводную кислоту. Уксусную кислоту обезвоживают также перегонкой над P_2O_5 .

Пропионовая кислота (пропановая кислота). Кислоту сушат над безводным сульфатом натрия и подвергают фракционной перегонке, собирая среднюю фракцию при 140.7 °C.

Азотсодержащие растворители представляют собой амины, нитрилы, нитросоединения, амиды и гетероциклические соединения, требующие разного подхода к очистке.

Анилин (аминобензол, фениламин) осушают над гидроксидом натрия или калия, перегоняют 4 раза при пониженном давлении, отбрасывая каждый раз первую и последнюю порции дистиллята и используют сразу после перегонки. В остальных случаях его хранят в темной посуде в вакуумном эксикаторе. Анилин исключительно гигроскопичен.

Ацетонитрил (нитрил уксусной кислоты, цианометан) очищают от примесей, поглощающих в УФ-области, кипячением с перманганатом калия с последующей перегонкой. Кипятить с разбавленными кислотами или использовать его в контакте с сильными кислотами не следует. В колбу вместимостью 2 л помещают 1.5 л ацетонитрила и 30 г $KMnO_4$, кипятят с обратным холодильником 1 ч и перегоняют с дефлегматором, отбирая фракции по 200 мл. Когда в кубе останется около 200 мл продукта, перегонку прекращают. Остаток можно смешивать с новой порцией растворителя. Первую фракцию отбрасывают, а остальные проверяют на поглощение в УФ-области. Современные хроматографы позволяют регистрировать УФ-спектры, возможно получение спектров на спектрофотометре. Если в распоряжении находится одноволновой УФ-детектор упрощенной конструкции, заполняют рабочую кювету УФ-детектора по очереди водой высшей очистки и испытуемым растворителем (сравнительная кювета заполнена воздухом). Чем меньше при этом разница показаний детектора, тем выше качество растворителя. Обычно при такой очистке получают около 1 л ацетонитрила, пригодного для работы в градиентном режиме при 254 нм.

Ацетонитрил используют в основном в обращенно-фазовых водных элюентах. Для этих целей тщательная осушка не обязательна. От ненасыщенных примесей ацетонитрил можно очистить, смешивая 1 объем ацетонитрила с 1 объемом воды, после чего эти примеси трижды экстрагируют гексаном по 0.2 объема. Гексановые фракции отбрасывают, водно-ацетонитрильную фракцию перегоняют с дефлегматором, контролируя состав азеотропа газохроматографическим методом.

При необходимости для более тонкой очистки ацетонитрила рекомендуется следующий метод [152]. Ацетонитрил, содержащий воду, предварительно высушивают, затем перемешивают с CaH_2 до прекращения выделения газа и перегоняют над P_2O_5 (≤ 5 г/л) в *стеклянной* аппаратуре с дефлегматором с высоким флегмовым числом. Дистиллят кипятят с обратным холодильником над CaH_2 (5 г/л) не менее 1 ч, затем медленно перегоняют, отбрасывая первые 5% и последние 10% дистиллята, для того чтобы уменьшить содержание акрилонитрила. Если ацетонитрил содержит в качестве примеси бензол (полоса поглощения в УФ-спектре при 260 нм, интенсивный “хвост” при 220 нм), последний удаляют азеотропной перегонкой с водой перед обработкой P_2O_5 .

Бензонитрил (цианобензол, нитрил бензойной кислоты) перегоняют с водяным паром, промывают дистиллят раствором карбоната натрия для удаления примеси

Диметилформамид (ДМФА, N,N-диметилформамид, N,N-диметиламид метановой кислоты) может содержать примеси воды и муравьиной кислоты. Растворитель перемешивают или встряхивают с КОН и перегоняют над СаО или ВаО.

Диэтиламин (этиламиноэтан) и **триэтиламин** (диэтиламиноэтан) сушат над активированным оксидом алюминия и трижды перегоняют при пониженном давлении.

Нитроалканы, поступающие в продажу, с числом атомов углерода от 1 до 3 можно достаточно хорошо очистить высушиванием над хлористым кальцием или P_2O_5 с последующей осторожной перегонкой.

Нитробензол, очищенный дробной кристаллизацией (Т пл. 5.76°C) и перегонкой над P_2O_5 , бесцветен. Растворитель, содержащий примеси, быстро окрашивается над P_2O_5 . Чистый растворитель остается бесцветным даже после продолжительного контакта с P_2O_5 .

Нитрометан для хроматографии не требует химической очистки, достаточно его перегнать.

Пиперидин (гексагидропиперидин, пентаметиленимин) осторожно перегоняют над гранулами NaOH или КОН или металлическим натрием. Жидкость более высокой чистоты получают частичной кристаллизацией дистиллята (Т пл. -10°C) и повторной перегонкой закристаллизовавшейся части растворителя.

Пиридин высушивают в течение длительного времени над гранулами КОН, затем перегоняют над ВаО. Следует иметь в виду, что пиридин очень гигроскопичен (образует гидрат, Т кип. $94,5^\circ$), поэтому необходимо следить, чтобы в очищенный растворитель не попадала влага.

Формамид (амид муравьиной кислоты, амид метановой кислоты) обрабатывают оксидом кальция (5 г на 1 л растворителя) и перегоняют под вакуумом, дистиллят подвергают дробной кристаллизации без доступа углекислого газа и влаги (до температуры заморозания 2.55°C). Формамид очень гигроскопичен.

5.6.9. Серосодержащие растворители

Серосодержащие растворители, применяемые в ЖХ – ДМСО и сероуглерод.

Диметилсульфоксид (ДМСО) может содержать, помимо воды, примеси диметилсульфида и сульфона. Для очистки его держат в течение 12 и более часов над свежим активированным оксидом алюминия, ВаО или NaOH. Затем перегоняют под уменьшенным давлением ($\sim 2-3$ мм рт. ст., т. кип. 50°) над гранулами NaOH или ВаО и хранят над молекулярным ситом 4А [152].

Сероуглерод представляет собой легко воспламеняющуюся и токсичную жидкость, поэтому при работе с ним необходимо соблюдать особые меры предосторожности. Перегонять растворитель следует очень осторожно, используя водяную баню, которую рекомендуется нагревать до температуры, ненамного превышающей температуру кипения CS_2 . Примеси серы из сероуглерода удаляют, встряхивая растворитель сначала с Hg, затем с холодным насыщенным раствором HgCl_2 и далее с холодным насыщенным раствором KMnO_4 , после чего сушат над P_2O_5 и перегоняют.

5.6.10. Вода

Вода представляет собой важнейший растворитель в обращенно-фазовой, ионообменной, гидродинамической, эксклюзионной хроматографии. Основными примесями в воде, которые мешают проведе-

нию хроматографического процесса, являются различные соли и микропримеси органического происхождения. Присутствие солей недопустимо в ионообменной хроматографии, а примеси органических соединений вызывают существенные затруднения в обращенно-фазовой хроматографии (особенно в градиентном элюировании) при использовании флуоресцентного и УФ-детекторов. В литературе описано много различных методов очистки воды [384,385]. Для удаления минеральных солей, видимо, наилучшим является деионизация на ионообменниках с последующей перегонкой в кварцевой посуде. Высокоомную воду, пригодную для работы на ионных хроматографах, получают также очисткой на электродиализаторах Elix фирмы Миллипор [385]. Удовлетворительная очистка от органических загрязнений достигается фильтрацией деионизированной воды через активированный уголь. Для высшей степени очистки воду пропускают через колонку с обращенно-фазовым сорбентом, которую потом регенерируют промывкой метанолом, ацетонитрилом или тетрагидрофураном. Очень эффективным является также жесткое УФ-облучение.

Для получения дистиллированной воды выпускают дистилляторы – кубы различной величины и производительности, снабженные электрообогревом. В дистилляторах пар отводится в меевиковый холодильник, питаемый холодной водой. По мере испарения в куб непрерывно поступает свежая вода по трубке соединяющей куб с рубашкой холодильника. В зависимости от размеров лабораторного аппарата производительность его может быть от 1 до 20 л в час. Перегнанную воду собирают в стеклянные бутылки, причем отводную трубку вставляют в горло бутылки, уплотняя ватой. Это предохраняет воду от попадания в нее пыли. Автоматические дистилляторы почти не требуют наблюдения. Электронагреватель необходимо периодически очищать механическим путем от накипи. Чем больше жесткость водопроводной воды, тем чаще следует проводить очистку. Дистиллированная вода всегда содержит незначительные следы посторонних веществ, попадающих в нее или из воздуха в виде пыли, или вследствие выщелачивания стекла посуды, в которой хранится вода, или в виде следов металла трубки холодильника, если дистиллятор не стеклянный. Кроме того, вместе с парами воды в приемник попадают растворенные в воде газы (аммиак, углекислый газ), а также некоторые летучие органические соединения,

которые могут присутствовать в воде, и, наконец, соли, которые попадают в дистиллят вместе с мельчайшими капельками воды, уносимыми паром. Для некоторых аналитических работ недопустимо присутствие в дистиллированной воде следов металлов. Для удаления их предложен способ обработки дистиллированной воды активированным углем. На 1 л дистиллированной воды прибавляют 1 каплю 2.5%-ного очищенного раствора аммиака и 0.4–0.5 г активированного угля БАУ, измельченного до зерен диаметром 0.15–0.20 мм. Воду встряхивают с углем, затем дают отстояться и несколько раз снова встряхивают, дают постоять не больше 1 мин, после чего отфильтровывают через беззольный фильтр. Первые 200–250 мл фильтрата отбрасывают. Полученный фильтрат проверяют на наличие мешающих ионов, которые будут определять при выполнении хроматографического анализа. Однако и такую воду полезно дополнительно очистить обработкой ее раствором дитизона. Для этого в большую делительную воронку до половины ее наливают дистиллированную воду, добавляют в среднем около 10% от объема взятой воды 0.001 %-ного раствора дитизона в четыреххлористом углероде и, плотно закрыв воронку, хорошо встряхивают ее в течение нескольких минут. Дают жидкости отстояться, сливают окрашенный раствор дитизона, добавляют такое же количество свежего раствора его, снова встряхивают и повторяют экстракцию до тех пор, пока раствор дитизона не перестанет изменять свой цвет, т. е. будет оставаться зеленым. Когда это будет достигнуто, к воде добавляют чистый четыреххлористый углерод и основательно встряхивают для удаления из воды растворившегося в ней дитизона.

Классический способ очистки дистиллированной воды от органических веществ заключается в ее вторичной перегонке при добавлении в воду немного (~0,1 г/л) марганцовокислого калия и нескольких капель серной кислоты.

Для задержания солей перегонный аппарат следует снабдить насадкой Кьельдаля или так называемой “чешской” насадкой, которая надежнее насадки Кьельдаля.

Когда нужна очень чистая вода, принимают особые меры предосторожности, предупреждающие попадание в воду каких-либо примесей, например, применяют серебряный или кварцевый холодильник. Приемник (также кварцевый или посеребренный или из специальных

сортов стекла, не подвергающихся выщелачиванию) закрывают хлор-кальциевой трубкой, наполненной соответствующим поглотителем, чтобы воспрепятствовать попаданию в перегнанную воду аммиака, углекислого газа, сероводорода и других примесей. Приемник можно также закрыть клапаном Бунзена, что является вполне достаточной мерой предосторожности от попадания из воздуха примесей во время перегонки. Само собой понятно, что примеси, летучие с водяным паром, должны быть предварительно удалены из воды (газы – кипячением, органические вещества – окислением и т. д.).

Нужно помнить, что в ОФХ следует отдавать предпочтение дважды перегнанной дистиллированной воде (так называемому бидистилляту). Для получения бидистиллята применяют специальные установки – бидистилляторы, обеспечивающие высокое качество получаемой воды. Качество каждой вновь поступающей в лабораторию партии дистиллированной воды (а также стоявшей длительное время в лаборатории) следует контролировать, определяя pH и солевой состав, используя pH-метрию и кондуктометрию. Бидистиллят должен иметь низкую электропроводность. Так, удельное сопротивление хорошей дистиллированной воды должно быть не меньше $5 - 10^5$ Ом/см.

Нужно взять за правило закрывать бутылки с запасом дистиллированной воды только стеклянными притертыми пробками. Хранить ее лучше в специальной пластиковой таре, так как продолжительное хранение дистиллированной воды в стеклянной посуде, даже из хорошего химически стойкого стекла, всегда приводит к загрязнению воды продуктами выщелачивания стекла. В качестве емкости для хранения высокочистой воды наилучшим образом подходит тефлоновая посуда, однако она дорога. Неплохие результаты для ионной хроматографии дает хранение в прозрачной или, лучше, темной посуде из полиэтилентерефталата (лавсана), в которой продают бутилированную питьевую и минеральную воду. Можно использовать посуду из полиэтилена или полипропилена высокого давления. Для особо ответственных работ следует брать только свежеперегнанный бидистиллят и дополнительно подвергать ее деионизации и фильтрации на специализированных установках, которые доводят качество бидистиллированной воды до сорта “вода для градиентной высокоэффективной и ионной хроматографии”. Для получения

чистой деминерализованной воды в последнее время активно применяют ионитовые фильтры. Действие их основано на способности ионообменных материалов избирательно связывать катионы или анионы солей. Очищаемую воду вначале пропускают через катионит, связывающий только катионы. В результате получается вода, имеющая кислую реакцию. Затем эту воду пропускают через анионит, связывающий только анионы. Вода, пропущенная через оба ионита, называется деминерализованной (т. е. не содержит минеральных солей). По качеству деминерализованная вода не уступает дистиллированной и часто соответствует бидистилляту. Ионитные фильтры постепенно насыщаются и перестают действовать, поэтому их надо периодически менять или регенерировать.

В качестве примера типовой системы для получения деионизированной воды приведем установку “Деионизатор Д-301” (ЗАО “НПКФ Аквилон”, Россия). Компактная установка, потребляемая мощность которой 100 Вт, снабжена тремя сменными картриджами ионообменных фильтров смешанного действия и картриджем с активированным углем, через которые прокачивается очищаемая вода (дистиллят или бидистиллят с удельным сопротивлением 1-1.5 МОм/см), залитая в резервуар емкостью не менее 3 л. Картриджи сорбируют из воды ионы и органические загрязнения до уровня соответственно 1 и 10 ppb, удельное сопротивление очищенной воды доводится до 16 МОм/см. При производительности не менее 5 л/час система “Деионизатор Д-301” обеспечивает бесперебойную работу 2-4 жидкостных и ионных хроматографов, обычно имеющих в аналитической лаборатории. Система “Деионизатор Д-301” автоматизирована, она имеет контроль уровня заполнения (индикатор) и опорожнения (индикатор и звуковой сигнал) резервуара, а также цифровой индикатор качества получаемой воды. Сменная кассета обеспечивает получение от 3000 (для воды из металлического медицинского дистиллятора типа Д-4) до 5000 (для воды из стеклянно-кварцевого бидистиллятора) литров воды для ВЭЖХ и ионной хроматографии.

Как видим, разные варианты ЖХ предъявляют к качеству воды достаточно строгие требования, поэтому стоимость этого растворителя сопоставима со стоимостью многих органических растворителей.

ГЛАВА 6.

СВОЙСТВА БИНАРНЫХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

Перечень физико-химических, полярных и эксплуатационных свойств растворителей включает параметры, тренды изменения которых в оптимальном направлении нередко противоположны. Например, чем чище растворитель, тем он дороже. Растворитель может иметь меньше вязкость, но быть более токсичным, или иметь слишком низкую температуру кипения, или высокое давление паров. Он может устраивать по большинству свойств, но быть слишком полярным или несовместимым с разбавителем.

Природа не осчастливила нас *menstruum universale* (идеальным универсальным растворителем по терминологии Парацельса), удачно сочетающим хроматографические свойства. В связи с этим возникла необходимость применения смешанных растворителей – бинарных, тернарных, реже кватернарных. Применение более чем 4-х компонентных растворителей, как показала хроматографическая практика, не дает существенных преимуществ и улучшения хроматографических свойств подвижной фазы. Варьируя качественным и количественным составом смесей из 2-х, 3-х растворителей, реже – 4-х, можно добиться сочетания хроматографических свойств, близкого к оптимальному для конкретной хроматографической задачи, при этом не мешает забывать о принципе “лезвия Оккама”, т.е. если можно обойтись меньшим числом компонентов смеси, предпочтение следует отдать этому составу подвижной фазы. В данной главе мы остановимся на зависимости коллигативных свойств смешанных бинарных растворителей от состава и обсудим, как они отражаются на свойствах хроматографической системы.

6.1. Плотность и объемные свойства

При выборе оптимального качественного и количественного состава ПФ следует учитывать, что более плотные растворители требуют меньшей высоты напора над входом в насос, что особенно важно для микроколоночной аналитической ВЭЖХ, осуществляемой на хроматографах упрощенной конструкции со шприцевым насосом

среднего давления. Отношение плотности к вязкости важно для сравнительной ВЭЖХ. Из-за перепада давления в трубопроводах возможен переход от ламинарного к турбулентному режиму потока, в результате чего в системе возрастает противодавление. Обработка и интерпретация многих важных для хроматографии свойств ПФ, прежде всего, рефрактометрических и диэлькометрических, элюирующей способности и полярности невозможны, если неизвестны объемные изменения в системе, а расчет вязкости вообще предполагает предварительное определение плотности смесей.

Проанализируем влияние объемной доли модификаторов на плотность некоторых типичных ПФ для ВЭЖХ и определим составы с максимальным отклонением объемных свойств от аддитивности.

В справочниках, приводящих данные “состав-свойство”, состав принято выражать преимущественно в молярных или в массовых соотношениях (процентах или долях) [387,388]. Состав ПФ в современных ВЭЖХ-системах регулируется автоматической подачей в смеситель заданных объемов ее компонентов, при ручном приготовлении элюента предпочтение также отдают объемным соотношениям. Чтобы адаптировать известные данные для сложившейся хроматографической практики, необходимо пересчитать молярную или массовую долю в объемную, а для этого плотность смеси должна быть определена экспериментально. Так, пересчет из молярной доли в массовую и обратно можно осуществить по уравнениям:

$$m_2 = \frac{1}{1 + [(1 - x_2) / x_2] \cdot M_1 / M_2} \quad (6.1)$$

$$x_2 = \frac{1}{1 + [(1 - m_2) / m_2] \cdot M_1 / M_2}, \quad (6.2)$$

где x_2 , m_2 – молярная и массовая доля модификатора, а M_1 и M_2 молекулярные массы компонентов бинарной смеси. Пересчет массовой доли в объемную следует выполнять по формуле:

$$\varphi_2 = m_2 \cdot \rho_{12} / \rho_2, \quad (6.3)$$

где ρ_{12} – плотность бинарной смеси, ρ_2 – плотность модификатора.

При автоматической дозировке компонентов ПФ за объемную долю модификатора принимают величину, найденную по формуле:

$$\varphi_{2, \text{доб}} = V_2 / (V_1 + V_2), \quad (6.4)$$

где V_1 и V_2 – смешиваемые объемы. При этом по умолчанию исходят из того, что плотность есть объемно-аддитивная функция состава, т. е.

$$\rho_{12} = \rho_2 \varphi_2 + \rho_1 (1 - \varphi_2). \quad (6.5)$$

Фиалков, проанализировав в своих работах более 100 систем [344,388], указывает на то, что в большинстве бинарных неводных смесей неидеальность систем приводит к относительным отклонениям экспериментальных значений ρ_{12} от рассчитанных по (6.5) примерно на 1%. Причем сжатие или расширение растворов равновероятно. Для водных смесей эти отклонения могут быть и больше. Но даже небольшое изменение состава ПФ, как известно, может изменить параметры удерживания сорбатов, поэтому при воспроизведении условий хроматографии необходимо его точно соблюдать, т.е. желательно учитывать неидеальность системы. В публикациях при описании условий ВЭЖХ приводят, как правило, соотношение объемов разбавителя и модификаторов. Из них легко найти по (6.4) величину $\varphi_{2,add}$. Для определения свойств ПФ по справочным данным, выраженным в x_2 , значение $\varphi_{2,add}$ можно определить по формуле:

$$\varphi_{2,add} = \frac{x_2 M_2 \rho_1}{x_2 M_2 \rho_1 + M_1 \rho_2 (1 - x_2)} \quad (6.6)$$

Однако для изучения и сопоставления хроматографических свойств ПФ с различным составом корректней использовать истинное значение φ_2 , рассчитанное по (6.7).

$$\varphi_2 = \frac{\rho_{12}}{\rho_2 \{1 + [(1 - N_2)/N_2] M_1 / M_2\}} \quad (6.7)$$

На проблему истинного состава ПФ, способа приготовления и расчета объемной доли обратил внимание еще Хеншен в [12]. Во избежание путаницы он предложил пользоваться взвешиванием и приводить в статьях массовые соотношения, однако этот способ в связи с техническими особенностями жидкостных хроматографов не прижился на практике.

При нахождении экспериментальных зависимостей $\rho_{12} = f(\varphi_2)$ в [389] применили параболические функции:

$$\rho_{12} = \rho_1 + \beta \rho_1 \varphi_2 + (\rho_2 - \beta \rho_1 - \rho_1) \varphi_2^2, \quad (6.8)$$

где β – эмпирический коэффициент, ρ_1 и ρ_2 – плотности разбавителя и модификатора, φ_2 – объемная доля модификатора. Уравнение (6.8) удоб-

нее для практических расчетов, чем полиномы третьей степени общего типа, так как содержит только один эмпирический коэффициент, ограничивает оптимизированную функцию при $\varphi_2 = 0$ или 1 значениями ρ исходных растворителей и с высокой степенью аппроксимации описывает изотермы. Коэффициенты корреляции R для (6.8) мало отличаются от R полинома третьей степени для рассматриваемых систем. В табл. 6.1 в качестве примера приведены экспериментальные значения плотности бинарных обращенно-фазовых элюентов [389].

В табл. 6.2. даны оптимизированные коэффициенты β для ряда ПФ. Значения ρ_{12} взяли из [386-389], величины φ_2 рассчитали по (6.7). Найдено, что коэффициент β коррелирует с разностью плотностей разбавителя и модификатора, но не линейно (рис.6.1), что и следовало ожидать при наличии систематического отклонения объемных свойств от аддитивности:

$$\beta = a + b \Delta \rho + c \Delta \rho^2, \quad (6.9)$$

где $a = 0.06$, $b = -1.03$, $c = 0.46$, $n = 23$, $R = 0.99$. Уравнение (6.9) позволяет оценить коэффициент β для ПФ, не приведенных в табл. 6.1, по разности плотностей растворителей. В целом можно сделать заключение, что чем больше разность плотностей смешиваемых растворителей, тем больше абсолютное значение эмпирического коэффициента β . Если

Таблица 6.1. Плотность ρ (г/см³) для систем вода – ТГФ, вода – ацетонитрил и вода – метанол при 20°C

Вода – ТГФ		Вода – ацетонитрил		Вода-метанол	
φ_2	ρ	φ_2	ρ	φ_2	ρ
0.0000	0.9985	0.0000	0.9985	0.0000	0.9985
0.0996	0.9914	0.1032	0.9840	0.0622	0.9886
0.2077	0.9864	0.2121	0.9675	0.1229	0.9815
0.3527	0.9760	0.3097	0.9462	0.2397	0.9666
0.4093	0.9665	0.4129	0.9267	0.3508	0.9515
0.5206	0.9620	0.5234	0.9113	0.4567	0.9335
0.6124	0.9468	0.6117	0.8831	0.6541	0.8946
0.7128	0.9344	0.7124	0.8590	0.8345	0.8469
0.8130	0.9230	0.8208	0.8417	0.9190	0.8202
0.9026	0.9038	0.9066	0.8108	0.9599	0.8062
1.0000	0.8897	1.0000	0.7835	1.0000	0.7917

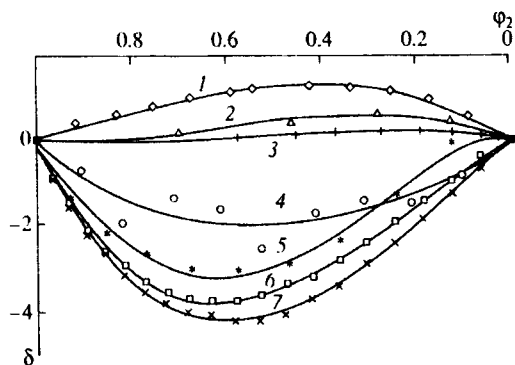


Рис. 6.1. Изотермы отклонения экспериментального объема от аддитивного $\delta - \varphi_2$ при 25°C для систем: 1 – циклогексан – диоксан; 2 – гексан – пропан-2-ол; 3 – гексан – пропан-1-ол; 4 – вода – ацетонитрил (20°C); 5 – вода – этанол; 6 – вода – метанол; 7 – вода – ацетон

модификатор плотнее разбавителя (наиболее типичный случай в НФХ), коэффициент $\beta > 0$. Если плотность разбавителя больше плотности модификатора (типичный случай для ОФХ), коэффициент $\beta < 0$.

В отличие от стандартных подходов, далее проанализируем не отклонения плотности от аддитивности, а более интересные для хроматографистов расхождения между $\varphi_{2,add}$ и φ_2 . В табл. 6.3 приведены максимальные отклонения $\varphi_{2,add}$ от φ_2 , выраженные через δ , и указаны значения φ_2 , при которых они имеют место.

$$\delta = \left(1 - \frac{\varphi_2}{\varphi_{2,add}}\right) \cdot 100 \quad (6.10)$$

В обращенно-фазовых ПФ взаимодействия, связанные с образованием гетеромежмолекулярных ассоциатов, приводят к сжатию сме-

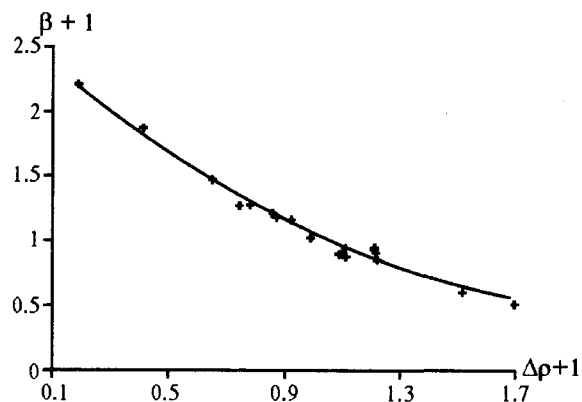


Рис. 6.2 Зависимость коэффициента β от разности плотностей смешиваемых растворителей

Таблица 6.2. Значения эмпирических коэффициентов β уравнения (6.7) для изотерм плотности бинарных систем при 25 °С

Система ($\varphi_2=0-1$)	β	R	n
Гептан – диоксан	0.473 ± 0.004	0.99996	12
Циклогексан – диоксан	0.278 ± 0.003	0.99992	13
Гептан – этилацетат	0.285 ± 0.002	0.99992	21
Гексан – хлороформ	1.217 ± 0.006	0.99999	10
Гексан – 1,2-дихлорэтан	0.88 ± 0.04	0.99954	9
Гексан – пропан-1-ол	0.214 ± 0.002	0.99994	10
Гексан – пропан-2-ол	0.173 ± 0.009	0.99967	6
Гексан – этанол	0.188 ± 0.002	0.99985	16
Дихлорметан – пропан-1-ол	-0.391 ± 0.008	0.99961	13
Хлороформ – метанол	-0.485 ± 0.018	0.99911	11
Этилацетат – метанол	-0.116 ± 0.001	0.99999	12
Диэтиловый эфир – метанол	0.160 ± 0.003	0.99887	21
Бензол – метанол	-0.101 ± 0.001	0.99999	27
Ацетонитрил – метанол	0.027 ± 0.001	0.99688	17
ТГФ – метанол	-0.094 ± 0.002	0.99986	21
Вода – этанол (20 °С)	-0.068 ± 0.007	0.9981	21
Вода – этанол	-0.071 ± 0.011	0.99849	11
Вода – метанол	-0.072 ± 0.021	0.99807	12
Вода – метанол (20 °С)	-0.062 ± 0.010	0.99608	21
Вода – тетрагидрофуран (20 °С)	-0.043 ± 0.006	0.99829	11
Вода – ацетон	-0.047 ± 0.011	0.99586	21
Вода – ацетонитрил (20 °С)	-0.133 ± 0.009	0.99886	11
Вода – пропан-2-ол	-0.084 ± 0.002	0.99952	101

си и в результате – к отрицательным значениям δ . Положение максимального по абсолютной величине отклонения δ обусловлено в конечном итоге стехиометрией ассоциатов и конкуренцией гомо- и гетеромежмолекулярных взаимодействий двух растворителей.

В нормально-фазовых элюентах, напротив, диссоциация гомомежмолекулярных ассоциатов полярного модификатора, не взаимодействующего с разбавителем, может приводить к расширению, т. е. к положительным δ . Для ПФ с галогенсодержащими компонентами, имеющих большую разницу растворителей по плотности, мо-

Таблица 6.3. Максимальные отклонения δ для бинарных систем при 25 °С

Система	$\delta, \%$	φ_2
Гептан – диоксан	1.1	0.40
Циклогексан – диоксан	1.3	0.42
Гептан – этилацетат	0.9	0.40
Гексан – хлороформ	0.7	0.55
Гексан – 1,2-дихлорэтан	1.3 и -1.3	0.25 и 0.80
Гексан – пропан-1-ол	0.2	0.25
Гексан – пропан-2-ол	0.6	0.30
Гексан – этанол	0.3	0.60
Дихлорметан – пропан-1-ол	0.3 и -0.7	0.36 и 0.83
Хлороформ – метанол	-0.3 и 1.2	0.15 и 0.75
Этилацетат – метанол	-0.1	0.48
Диэтиловый эфир – метанол	-1.2	0.40
Бензол – метанол	0.04	0.40
Ацетонитрил – метанол	-0.4	0.60
ТГФ – метанол	-0.4	0.40
Вода – этанол (20 °С)	-3.7	0.60
Вода – этанол	-3.2	0.60
Вода – метанол	-3.5	0.65
Вода – метанол (20 °С)	-3.7	0.63
Вода – ацетон	-4.2	0.58
Вода – ацетонитрил	-2.0	0.55
Вода – пропан-2-ол	-3.4	0.50
Вода – ТГФ (20 °С)	-1.7	0.55

гут наблюдаться S-образные изменения δ от φ_2 . На рис. 6.2 приведены примеры изотерм $\delta - \varphi_2$. Как видно из табл. 6.2, наибольшая разница между $\varphi_{2,add}$ и φ_2 имеет место для обращенных ПФ с составами близкими к эквиобъемному ($\varphi_2 = 0.4 \pm 0.6$) и составляет 2-4%.

6.2. Оптические свойства

Прозрачность ПФ является критическим требованием при использовании наиболее распространенного УФ-детектора. Предел прозрачности для выбранного элюента должен быть короче аналитической длины волны λ . В литературе по ВЭЖХ приводятся пределы пропус-

кания УФ-света индивидуальными растворителями, однако в качестве ПФ чаще используют смешанные, в частности, бинарные растворители. Казалось бы, величина оптической плотности за пределом прозрачности, т.е. при больших длинах волн, имеет второстепенное значение. Однако при использовании УФ-детектора предпочтение все равно отдают более прозрачным в УФ-свете элюентам. Низкие значения оптической плотности ПФ желательны из-за того, что при высоком фоновом поглощении, несмотря на то, что электроника детектора способна скомпенсировать сигнал до кажущегося нулевого поглощения, он в любом случае регистрирует суммарное поглощение элюента и растворенного вещества, а его чувствительность определяется разностью между коэффициентами поглощения ПФ и сорбата. При повышенном фоновом поглощении (оптической плотности элюента при аналитической длине волны), предел обнаружения сорбата может быть заметно искажен шумом нулевой линии, сокращается рабочий диапазон линейности детектора.

На рис. 6.3. – 6.11. приведены типичные примеры трехмерных диаграмм зависимости оптической плотности A от состава бинарных ПФ в диапазоне длин волн $\lambda = 200-300$ нм, полученные при 25 °С для слоя 10 мм в кварцевой кювете [367]. В качестве стандартного растворителя в кювету сравнения помещали воду. Для наглядности на рис. 6.7. и 6.8. приведены спектральные данные для ацетонитрила марки “чистый” и дополнительно очищенного в лабораторных условиях. Изотермы оптической плотности в бинарных растворителях нелинейны, особенно в области ниже 250 нм. В интервале 270-300 нм в первом приближении величину A_{12} можно считать аддитивной (отклонения от аддитивности составляют несколько %) и описывать ее линейной функцией:

$$A_{12} = A_2\varphi_2 + A_1(1-\varphi_2), \quad (6.10)$$

где A_{12} – суммарная оптическая плотность бинарной подвижной фазы, A_1 и A_2 – оптическая плотность разбавителя и модификатора при i -той аналитической длине волны, φ_2 – объемная доля модификатора. Однако при приближении аналитической волны λ к пределу прозрачности λ^* одного из компонентов ПФ ($A_i = 1.0$ при $\varphi_i = 1$) все заметней проявляется неаддитивность A_{12} . В связи с этим, если аналит имеет максимум поглощения в коротковолновой области

УФ-света или удовлетворительную растворимость только в растворителях с длинноволновым пределом прозрачности λ^* или концентрация аналита близка к порогу чувствительности метода, учет неаддитивного характера изотерм A_{12} позволит улучшить чувствительность и надежность методики хроматографического контроля данного аналита. Напомним проблему выбора ПФ при детектировании с помощью УФ-детектора жирных кислот, триглицеридов, фосфо- и гликолипидов, углеводов и аминокислот, имеющих весьма слабое поглощение в коротковолновой области УФ-спектра.

На рис. 6.12 даны зависимости пределов пропускания от состава $\lambda^*=f(\varphi_2)$ для ряда двухкомпонентных растворителей. Очевидно, что ни о каком соблюдении правила аддитивности для кривых $\lambda^*=f(\varphi_2)$ говорить не приходится. Такой вид кривых (кривые насыщения) нередко наблюдают при изучении сольватохромных эффектов бинарных растворителей на поглощение в УФ и видимой области спектров органических соединений с хромофорами [367]. Даже незначительное увеличение полярности смешанного растворителя может привести к резкому смещению спектра или увеличению интенсивности поглощения растворенного вещества. Так, зависимости $A=f(\varphi_2)$ в коротковолновой области в бинарных системах гексан – диоксан, гексан – хлороформ, гексан – этилацетат, вода – ацетонитрил, вода – ТГФ, вода – диоксан, по данным [390,391], имели вид кривых насыщения.

Для растворов в бинарных растворителях это явление трактуют особенностями микроструктуры ближайшего окружения молекул растворенного вещества. Считается, что молекулы последнего селективно сольватируются более полярным компонентом бинарного растворителя за счет универсальных межмолекулярных сил ориентационной природы. В бинарных системах состав сольватной оболочки молекулы растворенного вещества может в общем случае резко отличаться от состава раствора в целом, определяемого объемными соотношениями компонентов [392].

В эффект резкого возрастания величин λ^* и A_{12} при небольшом добавлении модификатора определенным вклад вносят, вероятно, не только УФ-поглощающие примеси, от которых не удалось полностью избавиться при очистке исходных растворителей, но также трансформация собственного поглощения модификатора, индуцированная

изменением полярности среды. Важным практическим выводом из найденного эффекта является необходимость учета возможного резкого ухудшения прозрачности элюента при повышении объемной доли в интервале $\varphi_2=0-0.1$ таких модификаторов, как диоксан, ТГФ, этилацетат, хлороформ, недостаточно очищенный ацетонитрил (это требование становится наиболее актуальным именно при использовании растворителей не слишком высокой степени очистки). Добавки к гексану и изооктану спиртов (пропан-2-ола, этанола), а также добавки к воде метанола и этанола не приводили к эффекту насыщения.

В [388] Фиалковым показано, что изотермы оптической плотности в двойных системах с химически не взаимодействующими компонентами (гексан – ацетон, декан – ацетон, бензол – ацетон) максимально отклоняются от аддитивности в 5-6 раз больше, чем изотермы объемных свойств, и в 9-11 раз больше, чем изотермы показателя преломления. Абсолютные отклонения для каждой данной длины волны увеличиваются с увеличением содержания поглощающего компонента, а для каждой данной смеси – с приближением λ к λ максимума поглощения. Таким образом, даже в смесях с высокочистыми растворителями будут наблюдаться отклонения от объемно-долевой аддитивности ΔA , вызванные не присутствием УФ-поглощающих примесей, а теми же физико-химическими равновесными процессами, возбуждающими отклонения от аддитивности объемных и рефракционных свойств.

Изотермы оптической плотности адекватно аппроксимируются параболическими функциями. В [390] они описаны уравнением (6.11), аналогичным зависимости для плотности бинарных систем (6.7):

$$A_{12} = A_1 + \alpha A_1 \varphi_2 + (A_2 - \alpha A_1 - A_1) \varphi_2^2 \quad (6.11)$$

где A_{12} – суммарная оптическая плотность при данной длине волны, α – эмпирический коэффициент. При $\varphi_2 = 0$ или 1 значения A_{12} равно A_1 или A_2 . Уравнение (6.11) точнее, чем (6.10) описывает изотермы не только в “слепой” для детектирования области длин волн, но и в прозрачной, наиболее важной в аналитической практике области 250-300 нм (табл. 6.4), экстремумы отклонений от аддитивности, по нашей оценке, лежат вблизи эквиобъемных составов ($\varphi_2=0.40-0.60$), а их положение с точностью ± 0.05 объемных долей совпадает с положением экстремумов в изотермах объемных свойств рассмотрен-

ных бинарных систем. Это служит одним из доводов того, что зависимости (6.11) носят неслучайный характер. Другим доводом является тенденция возрастания величины эмпирического коэффициента α с увеличением разности в пределах пропускания УФ-света модификатором и разбавителем $\Delta\lambda^* = \lambda_2^* - \lambda_1^*$, наблюдаемая в диапазоне линейности спектрофотометра. Например, при 250 нм для 6 нормально-фазовых ПФ имеет место тесная линейная корреляция $\lg(\alpha) = k_1 + k_2 \Delta\lambda^*$, где $k_1 = -0.022$, $k_2 = 0.131$ ($R=0.96$).

Для обращенно-фазовых ПФ уравнение (6.11) непригодно, так как по условию эксперимента оптическая плотность воды $A_1 = 0$. Поэтому в [390] применили уравнение (6.12), учитывающее это ограничение и ограничение $A_{12} = A_2$ при $\phi_2 = 1$

$$A_{12} = (A_2 - \alpha)\phi_2 + \alpha\phi_2^2 \quad (6.12)$$

где α – эмпирический коэффициент. Уравнение (6.12) также адекватней, чем линейная регрессия описывает экспериментальные данные (табл. 6.5).

Таким образом, анализ изотерм $A_{12} = f(\phi_2)$ указывает на возможность существования не только “кажущихся” отклонений от закона Бугера – Ламберта – Бера, вызванных примесями или аппаратными артефактами (неидеальной монохроматичностью потока лучистой энергии, флуктуациями температуры, большой погрешностью измерения величин $A > 2$), но и “истинных” отклонений, связанных с протеканием процессов ассоциации и диссоциации и степенью сольватации поглощающих частиц.

Как видно из рис. 6.12, к пределу прозрачности λ^* индивидуального растворителя не надо подходить, как к абсолютному пороговому значению, исключая возможность использовать данный растворитель при аналитической длине волны ниже предела его прозрачности в УФ-свете. Элюенты, содержащие 5-10% модификатора, зачастую имеют приемлемый уровень фонового поглощения, не мешающего анализу на более низких длинах волн, чем λ^* . Более того, можно привести пример применимости кетонов в качестве малообъемного модификатора ($\phi_2 < 0.10$) при контроле аналитов в диапазоне $\lambda = 205-220$ нм, несмотря на то, что их пределы пропускания находятся в области $\lambda^* = 320-340$ нм. Такая возможность обнаружена при изучении УФ-спектров водных растворов кетонов (рис. 6.13), имеющих “окно” – минимум поглощения в области 210 нм [339].

К оптическим свойствам бинарных растворителей следует отнести не только собственное поглощение, но и специфические эффекты растворителей на спектры поглощения в УФ и видимом диапазоне

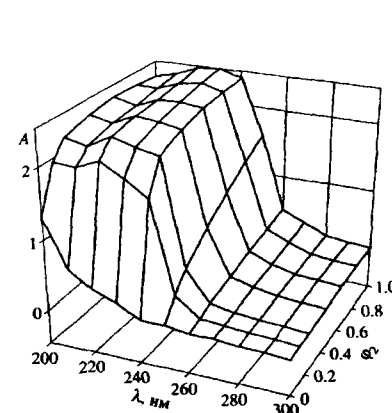


Рис. 6.3. Зависимость оптической плотности от объемной доли компонентов и длины волны для ПФ гексан – этилацетат

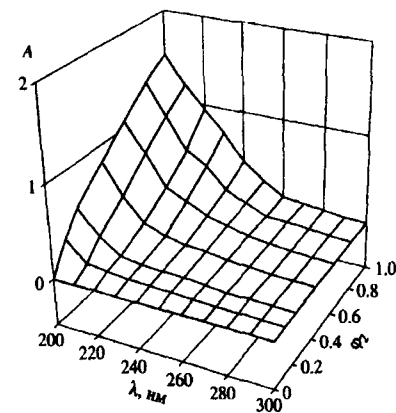


Рис. 6.4. Зависимость оптической плотности от объемной доли компонентов и длины волны для ПФ вода – метанол

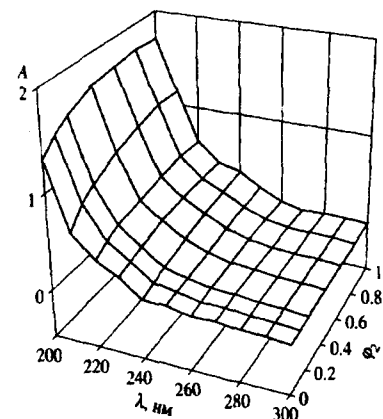


Рис. 6.5. Зависимость оптической плотности от объемной доли компонентов и длины волны для ПФ гексан – пропан-2-ол

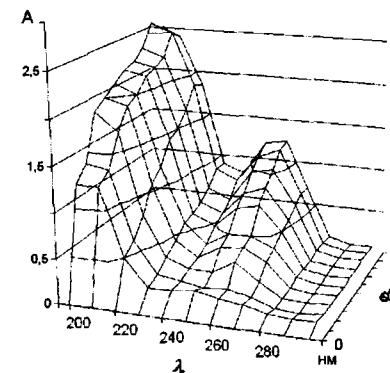


Рис. 6.6. Зависимость оптической плотности от объемной доли компонентов и длины волны для ПФ вода – ацетонитрил (марка “чистый”)

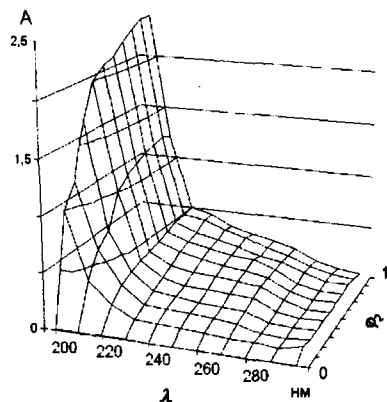


Рис. 6.7. Зависимость оптической плотности от объемной доли компонентов и длины волны для ПФ вода – ацетонитрил (после специальной очистки последнего от УФ-поглощающих примесей)

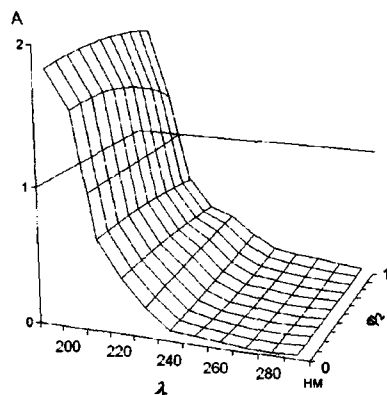


Рис. 6.9. Зависимость оптической плотности от объемной доли компонентов и длины волны для ПФ изооктан – пропан-2-ол

(сольватохромные эффекты). Причина этих эффектов заключается в том, что взаимодействия между молекулами растворенного вещества

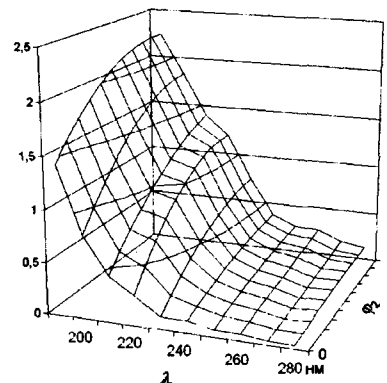


Рис. 6.8. Зависимость оптической плотности от объемной доли компонентов и длины волны для ПФ гексан – этанол

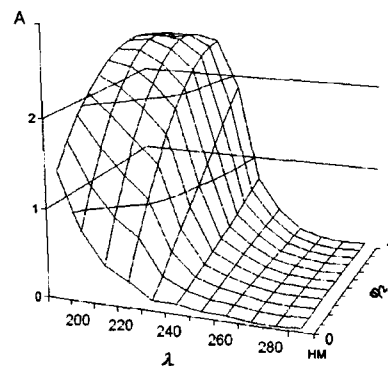


Рис. 6.10. Зависимость оптической плотности от объемной доли компонентов и длины волны для ПФ гексан – диоксан

Таблица 6.5. Значения коэффициентов λ уравнения (6.11) и $\Delta\lambda^*$ для изотерм оптической плотности бинарных систем для НФХ при 25 °С

Система, $\Delta\lambda^*(\text{нм})$	$\lambda (\text{нм})$	A_1	A_2	α	R
Гексан - диоксан, 20	250	0.133	0.733	4.68 ± 0.20	0.9992
	260	0.060	0.360	7.30 ± 0.26	0.9985
	270	0.070	0.144	2.22 ± 0.06	0.9986
	280	0.040	0.040	2.11 ± 0.11	0.9909
Гексан - хлороформ, 45	250	0.133	2.093	12.63 ± 1.48	0.9953
	260	0.060	1.390	17.50 ± 0.83	0.9991
	270	0.070	0.070	5.22 ± 0.52	0.9985
	280	0.040	0.040	1.83 ± 0.48	0.9897
Гексан – этилацетат, 55	250	0.133	1.583	21.55 ± 0.77	0.9978
	260	0.060	0.498	9.49 ± 0.32	0.9987
	270	0.070	0.350	3.47 ± 0.06	0.9998
	280	0.040	0.180	5.95 ± 0.03	0.9999
Гексан - пропан-2-ол, 10	250	0.133	0.203	1.38 ± 0.05	0.9982
	260	0.060	0.090	2.49 ± 0.09	0.9908
	270	0.070	0.034	0.89 ± 0.07	0.9924
	280	0.040	0.034	1.77 ± 0.04	0.9965
Гексан - этанол, 5	250	0.133	0.373	2.61 ± 0.27	0.9908
	260	0.060	0.260	3.93 ± 0.38	0.9907
	270	0.070	0.259	2.51 ± 0.32	0.9903
	280	0.040	0.155	1.52 ± 0.25	0.9950
Изооктан – пропан-2-ол, 5	250	0.073	0.203	1.53 ± 0.08	0.9983
	260	0.056	0.090	0.55 ± 0.08	0.9827
	270	0.049	0.034	-0.73 ± 0.08	0.9328
	280	0.035	0.034	-0.68 ± 0.06	0.9003

и растворителя изменяют разность энергий между основным и возбужденным состояниями поглощающих частиц, содержащих хромофорную группу. При увеличении доли полярного компонента может наблюдаться либо гипсохромный сдвиг (голубой или коротковолновый), либо батохромный (красный или длинноволновый) сдвиг. Наиболее сильный сольватохромный эффект характерен для молекул с π -электронной системой, в которых распределение зарядов (дипольный

Таблица 6.6. Значения коэффициентов α уравнения (6.12) для изотерм оптической плотности обращенно-фазовых ПФ при 25 °С

Система	λ , нм	A_2	α	R
Вода-метанол	250	0.220	-0.06 ± 0.01	0.9979
	260	0.101	-0.08 ± 0.02	0.9820
	270	0.080	-0.03 ± 0.01	0.9966
	280	0.052	-0.03 ± 0.01	0.9833
Вода - ТГФ	250	0.297	0.16 ± 0.04	0.9873
	260	0.070	0.011 ± 0.003	0.9927
	270	0.070	-0.010 ± 0.004	0.9955
	280	0.059	-0.021 ± 0.004	0.9927
Вода - ацетонитрил	250	0.521	-1.01 ± 0.12	0.9735
	260	0.225	-0.51 ± 0.10	0.8920
	270	0.090	-0.23 ± 0.04	0.8951
	280	0.084	-0.19 ± 0.04	0.8599

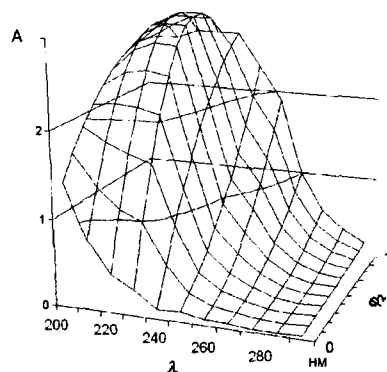


Рис. 6.11. Зависимость оптической плотности от объемной доли компонентов и длины волны для ПФ гексан – хлороформ

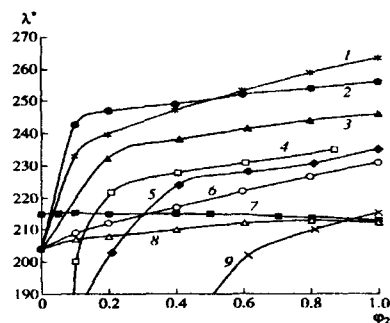


Рис. 6.12. Зависимость предела прозрачности λ^* от объемной доли компонентов для ПФ: гексан – хлороформ (1), гексан – этилацетат (2); гексан – диоксан (3); вода – ацетонитрил (4); вода – тетрагидрофур (5); гексан – этанол (6); изооктан – пропан-2-ол (7); гексан – пропан-2-ол (8), вода – метанол (9)

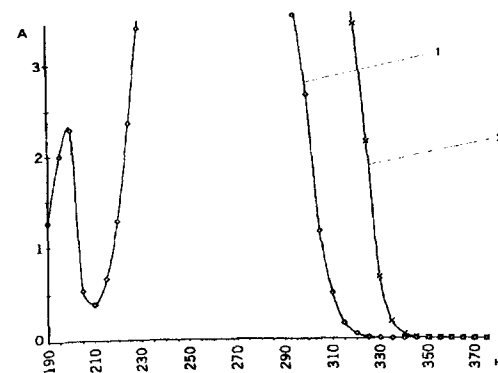


Рис. 6.13. Спектры поглощения: 1 – 10% раствора ацетона в воде; 2 – чистого ацетона

момент) в основном и возбужденном состоянии сильно различаются. Наиболее чувствительны к полярности смешанного растворителя бетаиновые красители [345]. Так, максимумы поглощения бетаиновых красителей при увеличении полярности смеси могут смещаться с 769 до 515 нм. Антоциановые красители, к примеру, в водно-спиртовых растворах при увеличении доли воды от $\phi=0$ до 1 изменяют максимум поглощения с 520-538 нм до 500-508 нм, а азосоединения – с 630-550 до 550-475 нм, сопряженные карбонилсодержащие соединения при замене метанола на воду дадут гипсохромный сдвиг на 8 нм. Таким образом, при оптимизации условий хроматографии следует помнить, что изменение состава ПФ приводит не только к изменению селективности и эффективности хроматографической системы, но и, в частности, к изменению максимума поглощения определяемого вещества, иногда весьма существенного.

6.3. Флуоресцентные свойства

Не безразличны к составу подвижной фазы и спектры флуоресценции. Если дипольный момент флуоресцирующей молекулы в возбужденном состоянии больше ее дипольного момента в основном состоянии, то усиление взаимодействий между молекулами аналита и растворителя будет сопровождаться резким снижением энергии испускаемого фотона. Следовательно, полоса флуоресценции будет претерпевать аномально большой батохромный сдвиг, т.е. полоса испускания флуоресценции сместится в сторону более длинных волн.

Например, лазерный краситель, представляющий собой производное 7-амино-4-фторметилкумарина в ацетонитриле максимально поглощает при 418 нм, а в воде – при 430 нм, λ_{max} его флуоресценции в ацетонитриле равна 521 нм, а в воде – 549 нм [345].

Существование таутомерных возбужденных молекул может привести к усложнению как самих спектров флуоресценции, так и характера их зависимости от состава растворителя. Между прочим, спектры флуоресценции органических соединений с короткоживущими (менее 1 нс) и долгоживущими (более 10 нс) электронно-возбужденными состояниями в бинарных смесях растворителей использовались для изучения явления *избирательной* (или *селективной*) *сольватации* биполярных молекул. Даже в смесях идеальных растворителей энергия эмиссии, отвечающей переходу $\pi^* \rightarrow \pi$, часто далеко не линейно зависит от мольной доли полярного растворителя. Отсутствие линейной зависимости обусловлено как неспецифическим взаимодействием растворителя с растворенным веществом, описываемым диэлектрическим обогащением сольватной оболочки биполярных молекул растворенного вещества, так и специфической ассоциацией последних с молекулами растворителя вследствие, например, взаимодействия донора электронной пары с акцептором электронной пары или образования водородных связей. И специфические, и неспецифические взаимодействия приводят к индуцированным молекулами растворенного вещества локальным и молекулярно-микроскопическим негетерогенностям в бинарной смеси растворителей.

Различная сольватация молекул, находящихся в основном или возбужденном состоянии, приводит не только к сдвигу максимума флуоресценции, но и к изменению относительных интенсивностей электронно-колебательных элементов тонкой структуры полос испускания. Например, усиление взаимодействия растворителя с растворенным веществом может сопровождаться заметным повышением интенсивности запрещенных правилами симметрии вибронных полос слабых электронных переходов.

6.4. Показатель преломления

Показатель преломления бинарных растворителей, в частности, бинарных подвижных фаз, как показано в [344,388,393], зависит от

состава не линейно, проявляя в большей или меньшей степени отклонения от аддитивности.

Рефрактометрические детекторы (РМД) являются неспецифическими детекторами. Важность определения эмпирических зависимостей показателя преломления от состава подвижной фазы обусловлена тем, что чувствительность РМД определяется разностью между коэффициентами n элюента и сорбата. В случае использования эквивалентных бинарных подвижных фаз, особенно в обращенно-фазовой ВЭЖХ, нижний предел обнаружения РМД (минимальное изменение показателя преломления, способное вызвать изменение выходного сигнала и достаточное для его надежного распознавания на фоне шумов нулевой линии) может быть заметно искажен, если не будет учтен эффект отклонения n от аддитивности. Кроме того, по величине показателя преломления двухкомпонентной подвижной фазы можно достаточно точно и аппаратно просто определять концентрацию модификатора, если известна частная зависимость “ n – состав подвижной фазы”. В литературе [335,387] приводятся величины n , как правило, отнесенные к молярной или массовой концентрациям компонентов, а для практики ВЭЖХ необходимы зависимости n от объемной доли модификатора, поскольку состав элюента формируют смешиванием заданных объемов разбавителя и модификатора. Для пересчета воспользуемся соотношениями (6.1), (6.2) и (6.3).

Проанализируем и обобщим с точки зрения практической ВЭЖХ влияние объемной доли модификаторов на показатель преломления ряда бинарных ПФ, определим составы с максимальным отклонением рефракции от аддитивности.

При выборе элюентов предпочтение отдают смесям растворителей с низкими значениями n и по умолчанию исходят из того, что n есть объемно-аддитивная функция состава, т. е.

$$n_{12} = n_2 \varphi_2 + n_1 (1 - \varphi_2), \quad (6.13)$$

где n_{12} – рассчитанный суммарный показатель преломления подвижной фазы, а n_1 и n_2 – показатели преломления разбавителя и модификатора, φ_2 – объемная доля модификатора.

Действительно, анализ изотерм более чем 150 двойных систем [388] указывает на то, что в большинстве бинарных смесей неидеальность систем приводит к относительным отклонениям экспери-

ментальных значений n_{12} от рассчитанных по (6.13) не более чем на 1.0%. Положительные и отрицательные отклонения Δn примерно равновероятны, для водных смесей отклонения от аддитивности по абсолютной величине выражены сильнее, чем для неводных.

Как показано выше, подобный характер отклонений от аддитивности имеет место в изотермах плотности бинарных жидкостей. Небольшие отклонения $\Delta \rho$ (0.3 – 1.0%) дают изотермы неводных смесей (нормально-фазовые элюенты) и максимальные отклонения (1.0 – 4.0%) наблюдаются у водных смесей (обращенно-фазовые элюенты). Аналогии вытекают из зависимости показателя преломления от объемных свойств. В соответствии с формулой Лорентца – Лоренца [311] n зависит от числа частиц в единице объема. В системах со сжатием Δn обычно положительны, а при расширении отрицательны.

В связи с тем, что плотность линейно связана формулой Лорентца-Лоренца с функцией показателя преломления, при нахождении эмпирических зависимостей $n_{12}=f(\varphi_2)$ в [394] применили параболические функции (6.14), аналогичные описанным в [389] для плотности.

$$n_{12}=n_1+\alpha n_1\varphi_2+(n_2-\alpha n_1-n_1)\varphi_2^2, \quad (6.14)$$

где α – эмпирический коэффициент. Уравнение (6.14) адекватно аппроксимирует изотермы $n_{12}=f(\varphi_2)$, коэффициент корреляции в большинстве случаев $R>0.99$. Справедливости ради следует отметить, что в некоторых системах изотермы $n_{12}=f(\varphi_2)$ лучше описываются полиномом 3-й степени. Поэтому для изотермы $n_{12}=f(\varphi_2)$ важнейшей обращенной подвижной фазы вода-метанол наряду с бинарным полиномом (6.14), имеющим не очень высокий коэффициент парной корреляции $R\approx 0.92$, предлагаем для прецизионных расчетов полином 3-й степени (6.15), имеющий такие же граничные условия, как и (6.14), а именно при $\varphi_2 = 0$ или 1 значения n равны показателю преломления исходных растворителей

$$n_{12}=n_1+\alpha n_1\varphi_2+(bn_2-\alpha n_1-n_1)\varphi_2^2+(n_2-bn_2)\varphi_2^3, \quad (6.15)$$

где эмпирический коэффициент α равен 0.0077 и 0.0123, а коэффициент b равен 1.0418 и 1.0379 при 298 и 293K, соответственно ($R=0.9975$ и 0.9991).

В табл. 6.7 приведены коэффициенты α уравнения (6.14) для типичных бинарных ПФ. Экспериментальные значения n_{12} взяли из [166, 167], величины φ_2 рассчитали по (6.1), (6.2) и (6.3) с учетом эф-

фекта сжатия или расширения объема смеси. Плотности смесей ρ_{12} заимствовали из [387, 389]. В качестве примера в табл. 6.7 представлены данные по показателю преломления для обращенно-фазовых бинарных растворителей.

В обращенных ПФ взаимодействия, связанные с образованием гетеромежмолекулярных ассоциатов, приводят к сжатию смеси и в результате, к отрицательным значениям относительного отклонения от аддитивности δ (6.16). Для таких смесей $\Delta n=n_{12}-n_{add}>0$, а изотерма $n_{12}=f(\varphi_2)$ имеет вид выпуклой кривой относительно оси состава.

$$\delta = (1 - n_{12}/n_{add}) \cdot 100, \quad (6.16)$$

где n_{add} – величина n_{12} , рассчитанная по аддитивному уравнению (6.13.)

Максимальные по абсолютной величине отклонения δ наблюдали в области эквиобъемных составов ($\varphi_2=0.40-0.60$). Их положение для рассмотренных систем с точностью ± 0.05 объемных долей совпадает с положением максимальных отклонений объемных свойств от аддитивности, т. е. оно обусловлено в конечном итоге стехиометрией ассоциатов и конкуренцией гомо- и гетеромежмолекулярных взаимодействий двух растворителей.

В нормально-фазовых ПФ, напротив, диссоциация гомомежмолекулярных ассоциатов полярного модификатора, не взаимодействующего с разбавителем, может приводить к расширению, которое можно охарактеризовать значениями $\delta>0$ (табл.6.8) и отрицательной разностью между экспериментальным и аддитивным показате-

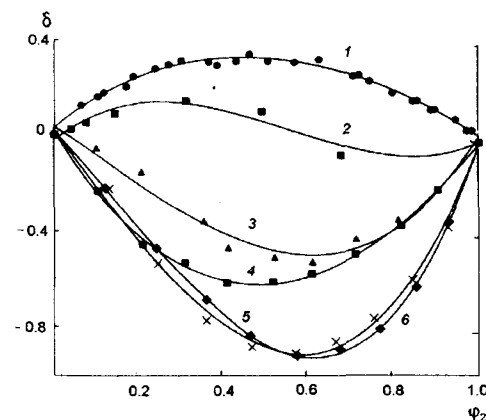


Рис. 6.14. Изотермы отклонения экспериментального показателя преломления от аддитивного $\delta=f(\varphi_2)$ при 25 °C для систем: циклогексан – этанол (1); гексан – 1,2-дихлорэтан (2); вода – ТГФ при 20 °C (3); вода – ацетонитрил при 20 °C (4); вода – этанол (5); вода – метанол (6)

лями преломления ($\Delta n < 0$). В отдельных случаях, по-видимому, могут иметь место S-образные изотермы, наиболее заметные в зависимостях δ от состава бинарной смеси. Такой ход изотерм возможен в системах и с взаимодействующими, и с не взаимодействующими компонентами [388]. Как видно из табл. 6.8 и рис. 6.14, подобный характер изотермы имеет место в системе гексан – 1,2-дихлорэтан, причем не только для показателя преломления, но и для плотности [389].

С точки зрения физико-химического анализа, отклонения n_{12} от аддитивности порядка 1% могут показаться не очень существенными. Но для рефрактометрического метода детектирования изменениями n во втором знаке после запятой пренебрегать нельзя. Такие изменения показателя преломления соответствуют, например, увеличению концентрации сахарозы в воде с 0 до 10% [335], в то время как нижний предел обнаружения современных РМД составляет

Таблица 6.7. Значения эмпирических коэффициентов α уравнения (3.14) для изотерм показателя преломления бинарных систем при 25 °С

Система ($\varphi_2 = 0-1$)	α	R	n
Гептан – диоксан	0.024 ± 0.001	0.9999	12
Циклогексан – диоксан	0.0021 ± 0.0001	0.9997	13
Гексан – 1,2-дихлорэтан	0.047 ± 0.001	0.9994	9
Гексан – этилацетат	-0.012 ± 0.001	0.9893	22
Циклогексан – этанол	-0.059 ± 0.001	0.9998	28
Дихлорметан – пропан-1-ол	-0.033 ± 0.001	0.9999	13
Этилацетат – метанол	-0.029 ± 0.001	0.9999	12
Диэтиловый эфир – метанол	-0.0068 ± 0.0005	0.9976	21
Бензол – метанол	-0.118 ± 0.001	0.9999	27
Ацетонитрил – метанол	-0.0111 ± 0.0001	0.9997	13
Тетрагидрофуран – метанол	-0.0546 ± 0.0001	0.9999	15
Вода – этанол (20 °С)	0.057 ± 0.001	0.9920	11
Вода – этанол	0.055 ± 0.001	0.9928	11
Вода – метанол	0.055 ± 0.001	0.9248	12
Вода – метанол (20 °С)	0.028 ± 0.001	0.9209	11
Вода – ТГФ (20 °С)	0.032 ± 0.002	0.9991	11
Вода – ацетон (20 °С)	0.074 ± 0.001	0.9849	11
Вода – ацетонитрил (20 °С)	0.062 ± 0.002	0.9987	11
Вода – пропан-2-ол (20 °С)	0.032 ± 0.001	0.9989	11

Таблица 6.8. Экспериментальные значения n для обращенно-фазовых ПФ при 20 °С [394]

Вода – ацетонитрил		Вода – ТГФ	
φ_2	n	φ_2	n
0.0000	1.3330	0.0000	1.3330
0.1032	1.3370	0.0996	1.3410
0.2121	1.3410	0.2077	1.3500
0.3097	1.3430	0.3527	1.3598
0.4129	1.3450	0.4093	1.3670
0.5234	1.3460	0.5206	1.3778
0.6117	1.3460	0.6124	1.3848
0.7124	1.3461	0.7128	1.3908
0.8208	1.3455	0.8130	1.3970
0.9066	1.3448	0.9026	1.4018
1.0000	1.3424	1.0000	1.4060

Таблица 6.9. Максимальные отклонения δ для различных бинарных систем при 25 °С

Система	$\delta, \%$	φ_2
Гептан – диоксан	0.2	0.50
Циклогексан – диоксан	-0.01	0.40
Гексан – этилацетат	0.3	0.49
Гексан – 1,2-дихлорэтан	0.2 и -0.1	0.30 и 0.67
Циклогексан – этанол	0.3	0.46
Дихлорметан – пропан-1-ол	0.2	0.50
Этилацетат – метанол	-0.1	0.42
Диэтиловый эфир – метанол	0.3	0.60
Бензол – метанол	0.1	0.61
Ацетонитрил – метанол	-0.2	0.50
ТГФ – метанол	-0.04	0.47
Вода – этанол (20 °С)	-0.9	0.58
Вода – этанол	-0.9	0.58
Вода – метанол	-0.8	0.55
Вода – метанол (20 °С)	-0.9	0.57
Вода – ацетон (20 °С)	-0.8	0.58
Вода – ацетонитрил (20 °С)	-0.6	0.50
Вода – пропан-2-ол (20 °С)	-0.7	0.47
Вода – ТГФ (20 °С)	-0.5	0.60

примерно $1 \cdot 10^{-8}$ Δ единиц n . В общем случае отклонения от аддитивности даже на $1 \cdot 10^{-4}$ единиц n имеют аналитическое значение. Популярным примером служит n_D при 273К 0.1% водного раствора сахаразы, равный 1.3331 и отличающийся от n_D чистой воды (1.3330) на $1 \cdot 10^{-4}$ единицы n .

Таблица 6.10. Зависимость показателя преломления обращенных подвижных фаз вода – модификатор от температуры в диапазоне 25-50°C [393]

Модификатор	Об. %	Температура, С°					
		25	30	35	40	45	50
метанол	0	1.3325	1.3321	1.3316	1.3309	1.3300	1.3292
	10	1.3341	1.3336	1.3330	1.3321	1.3310	1.3303
	20	1.3360	1.3357	1.3352	1.3339	1.3330	1.3318
	30	1.3382	1.3378	1.3366	1.3352	1.3343	1.3337
	40	1.3402	1.3393	1.3376	1.3369	1.3358	1.3342
	50	1.3412	1.3400	1.3386	1.3374	1.3360	1.3348
	60	1.3412	1.3400	1.3388	1.3372	1.3355	1.3342
	70	1.3401	1.3389	1.3371	1.3359	1.3340	1.3318
	80	1.3375	1.3356	1.3344	1.3330	1.3313	1.3298
	90	1.3333	1.3316	1.3305	1.3290	1.3259	1.3244
	100	1.3269	1.3248	1.3235	1.3212	1.3192	1.3168
ацетонитрил	0	1.3329	1.3322	1.3318	1.3310	1.3300	1.3292
	10	1.3372	1.3362	1.3352	1.3341	1.3332	1.3312
	20	1.3408	1.3397	1.3385	1.3371	1.3360	1.3335
	30	1.3432	1.3416	1.3403	1.3391	1.3375	1.3356
	40	1.3448	1.3443	1.3418	1.3402	1.3382	1.3365
	50	1.3454	1.3440	1.3422	1.3409	1.3388	1.3372
	60	1.3460	1.3441	1.3425	1.3411	1.3391	1.3364
	70	1.3458	1.3438	1.3420	1.3404	1.3382	1.3358
	80	1.3452	1.3430	1.3412	1.3390	1.3373	1.3342
	90	1.3433	1.3413	1.3393	1.3373	1.3346	1.3315
	100	1.3422	1.3396	1.3375	1.3350	1.3320	1.3298
ТГФ	0	1.3326	1.3322	1.3318	1.3310	1.3302	1.3292
	10	1.3398	1.3395	1.3382	1.3379	1.3362	1.3347
	20	1.3487	1.3472	1.3468	1.3452	1.3445	1.3424
	30	1.3583	1.3538	1.3528	1.3512	1.3509	1.3510
	40	1.3650	1.3647	1.3613	1.3593	1.3580	1.3543
	50	1.3741	1.3727	1.3712	1.3672	1.3670	1.3649
	60	1.3818	1.3805	1.3782	1.3745	1.3730	1.3715
	70	1.3889	1.3864	1.3854	1.3820	1.3795	1.3778
	80	1.3943	1.3922	1.3910	1.3882	1.3863	1.3842
	90	1.4010	1.3988	1.3962	1.3938	1.3915	1.3891
	100	1.4051	1.4030	1.4000	1.3975	1.3948	1.3925

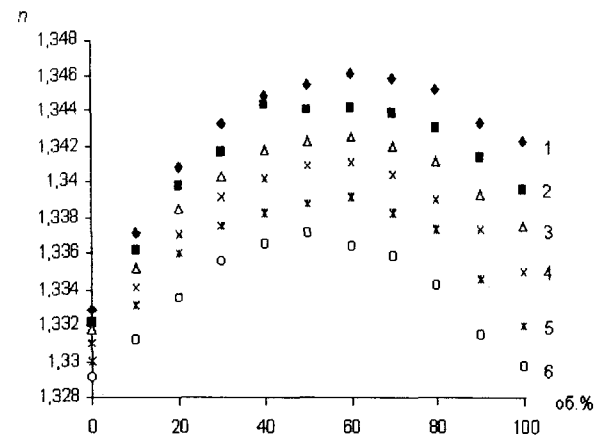


Рис. 6.15. Изотермы показателя преломления в системе вода – ацетонитрил при: 1 – 25°C; 2 – 30°C; 3 – 35°C; 4 – 40°C; 5 – 45°C; 6 – 50°C

Известно, что нижний предел обнаружения РМД может искажаться температурной зависимостью n (изменение на 1 °C приводит к изменению n на $2 \cdot 10^{-4}$ единицы). С повышением температуры показатель преломления уменьшается.

В табл. 6.10 приведены данные по влиянию температуры и состава на показатель преломления в трех типовых обращенных подвижных фазах, а на рис. 6.15 показаны изотермы показателя преломления при 6-ти температурах в системе вода – ацетонитрил. Определенное влияние на показатель преломления оказывает и давление. Изменение показателя преломления составляет около $5 \cdot 10^{-4}$ единиц n на 1 МПа (диапазон рабочего давления насоса для ВЭЖХ равен 1-20 МПа).

Таким образом, при оптимизации качественного и количественного состава подвижных фаз, при сопоставлении и интерпретации хроматографических данных для систем жидкостной хроматограф – РМД, следует учитывать побочные эффекты температуры и давления.

6.5. Вязкость

Динамический коэффициент вязкости является одной из ключевых физико-химических величин, характеризующих свойство жидкостей оказывать сопротивление перемещению одного ее слоя от-

носителем другого. Противодействие, возникающее в хроматографической системе, и, в первую очередь, в колонке, зависит от вязкости растворителя, извилистости пути потока по хроматографическому тракту (по колонке, капиллярным трубкам, ячейке детектора) и от скорости потока.

Причиной медленного увеличения противодействия колонки является ее старение. Частицы кварца ломаются под непрерывным действием высоких давлений и из-за напряжений, обусловленных вязким потоком. Образующиеся маленькие фрагменты (осколки) неподвижной фазы забивают промежутки между зернами сорбента и препятствуют потоку растворителя, приводя к росту рабочего давления. Аналогично и с тем же эффектом происходит разрушение пористых фильтров, стенок капилляров и внутренней поверхности колонки. Поэтому для увеличения жизни колонки и уменьшения затрат на профилактическое обслуживание насосов хроматографа целесообразно работать с вязкими растворителями.

Обычно в монографиях по ВЭЖХ мало внимания уделяется изотермам вязкости смешанных подвижных фаз. Вместе с тем, вязкость влияет не только на качество механической работы хроматографа (при одинаковой скорости элюирования, например, менее вязкие подвижные фазы требуют меньшего входного давления), но и на эффективность хроматографической системы. Чем ниже вязкость подвижной фазы, тем эффективнее массообмен, выше скорость диффузии и, в конечном счете, меньше размытие хроматографических пиков [52]. Величины потерь эффективности из-за эффектов вязкости в хроматографической системе относительно малы по сравнению с эффектами изменения состава подвижной фазы и других переменных, влияющих на параметры хроматографической системы. Тем не менее, вязкость приобретает существенное значение, когда растворитель с низкой вязкостью заменяется растворителем со значительно более высокой вязкостью.

Особенно важна невысокая вязкость ПФ для микроколоночной аналитической ВЭЖХ, осуществляемой на хроматографах упрощенной конструкции со шприцевым насосом среднего давления (хроматографы серий "Милихром" и "Обь"). Вязкость определяет величину критерия Рейнольдса Re , который играет важную роль в

препаративной ВЭЖХ. Вследствие перепада давления в трубопроводах возможен переход от ламинарного к турбулентному режиму потока, в результате чего в системе возрастает противодействие. Если $Re < 2000$, доминирует ламинарный поток [59].

Известно, что вязкость смешанных растворителей зависит от состава не линейно, что вызывает проблемы, например, при градиентном режиме работы. Вязкость обращенно-фазовых элюентов нередко выше вязкости чистых компонентов. Так, вязкость смеси метанол – вода с соотношением компонентов 45:55 в 1.8 раза больше вязкости воды, а вязкость смеси 1-пропанол – вода, взятых в этих же пропорциях имеет вязкость в 2.5 раза больше вязкости чистой воды [339]. В результате роста вязкости в таком широком диапазоне при создании градиента 0-100% в системе спирт – вода противодействие возрастает в 2-3 раза. Это может привести к сбою работы хроматографа, если заранее не были соотнесены рабочие параметры (скорость потока, длина колонки, размер частиц сорбента) с нижним пределом противодействия системы. Самое высокое ожидаемое давление системы в течение градиента должно быть значительно ниже этого предела.

Проанализируем влияние объемной доли модификаторов на динамическую вязкость η часто используемых в хроматографии бинарных ПФ и определим составы с максимально положительными отклонениями величин η от аддитивности.

В справочной литературе, как уже отмечено выше, свойства смешанных растворителей отнесены к составам, выраженным в молярных или в массовых величинах. Для того чтобы разобраться по имеющимся данным влияние объемной доли модификатора на вязкость бинарных элюентов, необходимо пересчитать молярную или массовую долю в объемную по уравнениям (6.1), (6.2) и (6.3).

При описании условий ВЭЖХ приводят соотношение смешиваемых объемов разбавителя и модификаторов. Из них легко найти по (6.17) величину $\phi_{2, \text{акд}}$. Специально для хроматографистов нами рассчитаны поправочные коэффициенты для определения истинного значения ϕ_2 из величин $\phi_{2, \text{акд}}$ по уравнению (6.18), учитывающему неидеальность целого ряда нормальных и обращенных подвижных фаз (табл. 6.11):

$$\phi_{2, \text{акд}} = V_2 / (V_2 + V_1), \quad (6.17)$$

где V_2 – объем модификатора, V_1 – объем разбавителя.

$$\varphi_2 = \varphi_{2, \text{ид}} (\alpha \varphi_{2, \text{ид}} + \beta) \quad (6.18)$$

Уравнение (6.18) предназначено для практических расчетов и адекватно аппроксимирует параболические изменения объемных свойств бинарной ПФ с коэффициентами корреляции $R=1-0.9998$. Отрицательные значения α в уравнении (6.18) характерны для систем, испытывающих сжатие объема при смешивании. Чем больше абсолютное значение этого коэффициента, тем сильнее отклонения в системе от аддитивности.

Таблица 6.11. Значения поправочных коэффициентов α и β ур. (6.18) для определения истинного значения φ_2 в бинарных системах при 25 °С

Система ($\varphi_2 = 0-1$)	α	β
Циклогексан - диоксан	0.0197	0.9788
Циклогексан - этилацетат	0.0127	0.9865
Гексан – пропан-1-ол	0.0024	0.9976
Гексан – пропан-2-ол	0.0074	0.9927
Гексан - этанол	0.0043	0.9951
Гептан - диоксан	0.0170	0.9821
Гексан - хлороформ	0.0119	0.9876
Гексан - 1,2-дихлорэтан	0.0141	0.9858
Бензол - метанол	0.0006	0.9993
Диэтиловый эфир - метанол	-0.0155	1.0172
Дихлорметан – пропан-1-ол	0.0064	0.9979
Хлороформ - метанол	-0.0006	0.9948
Этилацетат - метанол	-0.0024	1.0024
Тетрагидрофуран - метанол	-0.0059	1.0060
Ацетонитрил - метанол	-0.0046	1.0060
Вода - этанол (20 °С)	-0.0441	1.0558
Вода - этанол	-0.0427	1.0515
Вода - ацетон	-0.0564	1.0688
Вода - пропан-2-ол	-0.0488	1.0553
Вода - ацетонитрил (20 °С)	-0.0298	1.0344
Вода - ТГФ (20 °С)	-0.0277	1.0301
Вода - метанол	-0.0503	1.0551
Вода - метанол (20 °С)	-0.0481	1.0601

Для описания изотерм вязкости существует большое количество уравнений с эмпирическими или теоретически обоснованными постоянными [388,395,396]. Все они обладают одним – двумя из перечисленных ниже недостатков: уравнение хорошо описывает изотермы только одной группы систем или часть изотермы большого числа систем: они имеют не очень высокую точность ($\pm 5\%$) или отличаются сложностью и большим количеством коэффициентов; наконец, состав смеси в них выражен, как правило, в молярных долях.

Для аппроксимации зависимостей $\eta_{12}=f(\varphi_2)$ в [396] нашли, что из простых функций, пригодных для технических расчетов, в большинстве рассмотренных ПФ максимально адекватное описание зависимостей дает рациональная функция

$$y = (a+bx)/(1+cx+dx^2). \quad (6.19)$$

Два коэффициента функции заменили значениями η исходных растворителей и преобразовали ее таким образом, что при $\varphi_2 = 0$ величина $\eta_{12} = \eta_1$, а при $\varphi_2 = 1$ величина $\eta_{12} = \eta_2$, получили уравнение

Таблица 6.11. Значения эмпирических коэффициентов A и B рациональной функции (6.20) для изотерм вязкости бинарных систем при 25 °С

Система ($\varphi_2 = 0-1$)	A	B	n	R
Гексан - пропан-1-ол (20 °С)	-1.61	0.73	6	0.99740
Гексан - пропан-2-ол (20 °С)	-1.68	0.75	6	0.99993
Гексан - хлороформ	1.07	-0.50	10	0.99987
Гексан - этанол	-1.17	0.47	22	0.99944
Циклогексан - диоксан	3.53	-1.86	13	0.99966
Циклогексан - этилацетат (20 °С)	3.16	-0.81	11	0.99991
Ацетонитрил - метанол	0.32	-0.73	7	0.98415
ТГФ - метанол	3.61	-0.91	12	0.99372
Хлороформ - метанол	-1.04	0.40	10	0.96723
Вода - ацетон	-2.20	1.93	17	0.99547
Вода - ацетонитрил (20 °С)	-1.05	1.45	11	0.99925
Вода - метанол	-2.13	1.66	12	0.98348
Вода - метанол (20 °С)	-1.97	1.24	6	0.95830
Вода - ТГФ (20 °С)	-2.42	2.22	11	0.99326
Вода - этанол	-2.42	2.32	11	0.97390

$$\eta_{12} = \{\eta_1 + [\eta_2(1+A+B) - \eta_1]\varphi_2\} / (1 + A\eta_2 + B\eta_2^2), \quad (6.20)$$

где η_{12} - коэффициент динамической вязкости смеси, а η_1 и η_2 - вязкости разбавителя и модификатора, φ_2 - объемная доля модификатора, A и B - эмпирические коэффициенты, характеризующие взаимодействие компонентов смеси. В табл. 6.11 приведены коэффициенты A и B уравнения (6.20) для типичных ПФ, а в табл. 6.12 - примеры вязкости обращенно-фазовых систем.

На рис. 6.16. приведены зависимости $\eta_{12} = (\varphi_2)$ для некоторых нормальных и обращенных ПФ, из него видно, что для обращенных ПФ характерен положительный экстремум в области, близкой к эквиобъемному составу ($\varphi_2 = 0.4 - 0.6$). Такого рода экстремумы, обусловленные взаимодействием компонентов смеси, ярко выражены для систем вода - этанол и вода - пропан-1-ол [339]. В этом плане ацетонитрил имеет уникальные преимущества перед другими растворителями, максимальная η его смеси с водой наблюдается в диапазоне $\varphi_2 = 0.1-0.2$ и только на 20 % больше вязкости чистой воды.

Таким образом, при выборе ПФ желательно избегать водно-спиртовых смесей с соотношением компонентов, близким к 1:1. Следует учесть также, что в условиях повышенных рабочих давлений

Таблица 6.12. Экспериментальные значения η (Па с) для систем вода - ацетонитрил, вода-метанол и вода - ТГФ [175]

φ_2	$\eta \times 10^3$	φ_2	$\eta \times 10^3$	$\eta \times 10^3$	φ_2
Вода - ацетонитрил (20 °С)		Вода - метанол (25°С)		Вода - ТГФ (20°С)	
0.0000	1.005	0.0000	0.894	0.0000	1.005
0.1032	1.050	0.0448	0.979	0.0996	1.297
0.2121	1.076	0.1008	1.101	0.2077	1.599
0.3097	1.029	0.2167	1.303	0.3527	1.855
0.4129	0.965	0.2987	1.481	0.4093	1.982
0.5234	0.882	0.6097	1.478	0.5206	1.931
0.6117	0.766	0.7901	1.119	0.6124	1.762
0.7124	0.648	0.9032	0.825	0.7128	1.433
0.8208	0.539	0.9755	0.643	0.8130	1.078
0.9066	0.420	0.9888	0.579	0.9026	0.722
1.0000	0.353	1.0000	0.547	1.0000	0.490

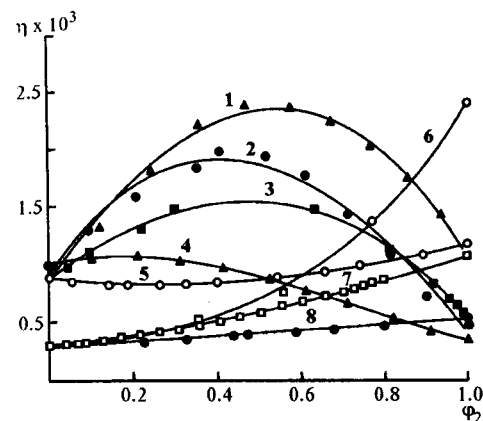


Рис. 6.16. Изотермы вязкости при 25°С для систем: 1 - вода - этанол; 2 - вода - ТГФ (20°С); 3 - вода - метанол; 4 - вода - ацетонитрил (20°С); 5 - циклогексан - диоксан; 6 - гексан - пропан-2-ол (20°С); 7 - гексан - этанол; 8 - гексан - хлороформ

(20-30 МПа) вязкость ПФ может дополнительно возрасти на 5-10%. Для рабочих давлений, присущих микроколоночным хроматографам (<4 МПа), влиянием давления на вязкость можно пренебречь.

Эффективным термодинамическим фактором воздействия на вязкость является повышение температуры. Зависимость $\eta = f(T)$ хорошо описывается эмпирическим уравнением $\eta = C/(1 + aT + bT^2)$ [395].

При нагреве на 10 °С вязкость индивидуальных и бинарных растворителей уменьшается на 4-20%, т.е. отрицательный эффект на работу хроматографической системы от повышения вязкости при необходимости можно нивелировать термостатированием при сравнительно невысоких температурах (40-70 °С), что и реализуется в ряде современных моделей жидкостных хроматографов. Если в качестве детектора используют рефрактометр, следует нагревать всю хроматографическую систему - резервуар для элюента: соединительные трубки, инжектор, колонку и детектор, только в этом случае гарантированы воспроизводимые результаты хроматографического разделения.

6.6. Диэлектрическая проницаемость

Диэлектрическая проницаемость ϵ , растворителей - одна из основных физико-химических характеристик растворителей. Она представляет интерес для хроматографистов по двум причинам. Во-первых, это один из критериев полярности растворителей. Имеются обширные справочные данные по значениям ϵ , для индивиду-

альных и бинарных растворителей [358,359], их легко определить экспериментально. Для типичного набора растворителей, применяемых для приготовления ПФ, наблюдается приблизительная корреляция между ϵ_r и другими критериями полярности, принятыми в жидкостной хроматографии: чем выше величина ϵ_r растворителя, тем он, как правило, более полярен. Во-вторых, влияние состава ПФ на диэлектрическую проницаемость следует учитывать при работе с детектором по диэлектрической проницаемости, который, как и рефрактометрический, является универсальным детектором, более чувствительным, чем РМД.

Проанализируем функции $\epsilon_{12} = f(\varphi_{pol})$, где ϵ_{12} – диэлектрическая проницаемость бинарной смеси, φ_{pol} – объемная доля более полярного компонента. Известно, что ϵ_{12} – неаддитивная величина, отклонения от аддитивности могут быть значительными и специфичными для каждой конкретной смеси [388]. Аппроксимация экспериментальных изотерм с помощью теоретических или полуэмпирических соотношений нередко приводит к расхождениям с экспериментом. Изотермы $\epsilon_{12} = f(\varphi_{pol})$ для бинарных смесей являются монотонно выпуклыми или монотонно вогнутыми кривыми, в отдельных случаях близкими к линейным зависимостям (рис. 6.16, 6.17) [344,377,388]. Характер кривых зависит от степени взаимодействия растворителей между собой, от способности их к ассоциации и самоассоциации, от соотношения этих конкурирующих процессов. Если отклонения изотерм от линейной зависимости малы, для расчета ϵ_{12} подвижных фаз предпочтительней использовать аддитивное уравнение (6.21):

$$\epsilon_{12} = \epsilon_1 \varphi_1 + \epsilon_2 \varphi_2, \quad (6.21)$$

где ϵ_1 и ϵ_2 диэлектрическая проницаемость компонентов подвижной фазы, а φ_1 и φ_2 – их объемные доли. Близкие к линейным изотермы характерны для смесей с небольшим различием в величинах ϵ_r , когда малополярные растворители смешаны с малополярными или сильнополярными — с сильнополярными. Максимальные различия величин ϵ_{12} , рассчитанных по (6.21), от наблюдаемых для таких смесей, составляет 0.5-10%. Уравнение (6.21) применимо и для приближенного расчета ϵ_{12} ПФ, у которых изотермы $\epsilon_{12} = f(\varphi_{pol})$ нелинейны, при условии, что объемная доля одного из компонентов много больше объемных долей другого (более 0.8)[377]. Наибольшие отклоне-

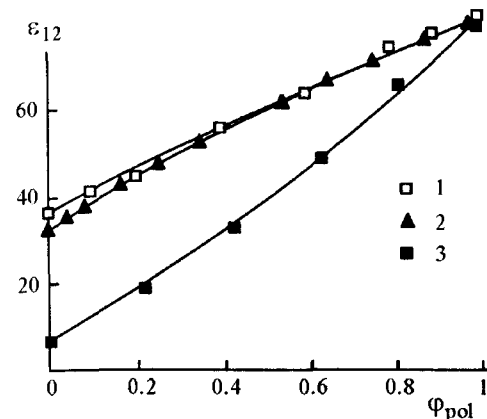


Рис. 6.17. Изотермы $\epsilon_{12} = f(\varphi_{pol})$ при 25 °С для подвижных фаз: 1 – ацетонитрил – вода, 2 – метанол – вода, 3 – тетрагидрофуран – вода

ния от аддитивности имеют место в смесях из неполярных и полярных растворителей $\varphi_{pol} = 0.2-0.8$, различие расчетных значений ϵ_{12} от наблюдаемых в таких составах может достигать 30%.

Для описания зависимостей ϵ_{12} от концентрации полярного компонента бинарной смеси в [397] приведена параболическая функция

$$\epsilon_{12} = x + yM_{pol} + zM_{pol}^2, \quad (6.22)$$

где x , y , z – постоянные, специфические для определенной смеси, M_{pol} – содержание полярного компонента, мас. %. Заменяем M_{pol} на φ_{pol} , а постоянные выразим через ϵ_r исходных растворителей так, чтобы $\epsilon_{12} = \epsilon_1$ при $\varphi_{pol} = 0$ и $\epsilon_{12} = \epsilon_2$ при $\varphi_{pol} = 1$, тогда полином принимает вид

$$\epsilon_{12} = \epsilon_1 + n\epsilon_1\varphi_2 + (\epsilon_2 - n\epsilon_1 - \epsilon_1)\varphi_2^2, \quad (6.23)$$

где ϵ_1 и ϵ_2 – диэлектрические постоянные менее и более полярного компонентов, а φ_2 – объемная доля более полярного компонента, n – эмпирический коэффициент.

Уравнение (6.23) удобнее для практических расчетов, чем уравнение общего типа, так как вместо трех эмпирических коэффициентов содержит только один и точно ограничивает оптимизированную функцию при $\varphi_2 = 0$ или 1 значениями ϵ_r исходных компонентов. Оно хорошо описывает экспериментальные зависимости, в том числе и изотермы, которые адекватно аппроксимируются аддитивным уравнением. В этих случаях квадратичный член полинома (6.23) принимает низкие значения, и зависимость $\epsilon_{12} = f(\varphi_{pol})$ выглядит практически линейной.

В табл. 6.13. приведены значения коэффициента n для ряда бинарных смесей. Величина n имеет тенденцию возрастать с увеличе-

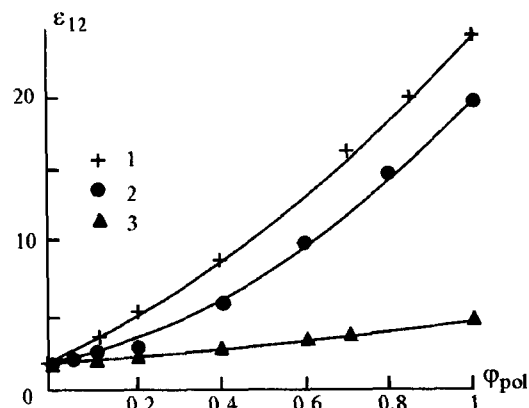


Рис. 6.18. Изотермы $\epsilon_{12} = f(\varphi_{\text{pol}})$ при 25 °С для подвижных фаз: 1 – гексан – этанол, 2 – гексан – пропан-2-ол, 3 – гексан – хлороформ

нием различия между ϵ_i смешиваемых растворителей. Если оба растворителя малополярны и не взаимодействуют друг с другом, то $n = 1$. Системы из двух полярных компонентов ($\epsilon_i > 15$), способных к конкурирующим между собой гомо- и гетеромежмолекулярным взаимодействиям, характеризуются также небольшими значениями $n = 0.5-3.3$. Если смесь состоит из двух не взаимодействующих компонентов, один из которых полярен, величина n находится в интервале 5-11. Смеси взаимодействующих слабо- и сильнополярных растворителей могут иметь высокие значения n , например, для смеси диоксан – вода $n = 24$.

Уравнение (6.23) идентично изотермам плотности и изотермам показателя преломления, различаются они только значениями эмпирических коэффициентов. И это не случайное совпадение и не прихоть авторов к единообразию. В соответствии с формулами Лорентца-Лоренца (6.24) и Клаузиуса-Моссоти (6.25), которые устанавливают линейную зависимость величин $(n^2-1)/(n^2+2)$ и $(\epsilon-1)/(\epsilon+2)$ от плотности жидкости, значения диэлектрической проницаемости ϵ_i и показателя преломления n связаны соотношением $\epsilon = n^2$ (в случае показателя преломления речь идет только об оптической области спектра).

$$(n^2-1)/(n^2+2) = (4\pi/3)(\alpha N/V), \quad (6.24)$$

где α – поляризуемость.

$$(\epsilon-1)/(\epsilon+2) = (4\pi/3)(\alpha N/V) \quad (6.25)$$

Отсюда можно сделать вывод, что в первом приближении (уравнения Лорентца-Лоренца и Клаузиуса-Моссоти носят приближенный

характер) показатель преломления и диэлектрическая проницаемость зависят только от плотности жидкости, а значит, экстремумы отклонений от аддитивности этих параметров теоретически должны совпадать с экстремумами, характерными для изотерм плотности. Поскольку плотность жидкости зависит от температуры, рассматриваемые показатели также чувствительны к температурным изменениям.

Для определения $\epsilon_{\text{сум}}$ трехкомпонентных ПФ можно строить трехкоординатные диаграммы [397], однако это требует большого числа измерений. Часто для расчета $\epsilon_{\text{сум}}$ трехкомпонентных ПФ используют аддитивное уравнение, как показано в [321,322], в целом ряде реально применяемых смесей наблюдаемые величины $\epsilon_{\text{сум}}$ мало отличаются от расчетных. В общем случае нелинейные изотермы диэлектрической проницаемости трехкомпонентных смесей точнее аппроксимируются полиномом второго порядка. Для этого необходимо свести трехкомпонентные системы к псевдобинарным. Ограничим изотермы значениями ϵ_i наименее и наиболее полярного компонента (ϵ_1 и ϵ_3), а в промежуточных составах будем варьировать только соотношение наименее и наиболее полярного компонента (φ_1 и φ_3), при постоянной объемной доле φ_2 компонента средней полярности (ϵ_2). Тогда упрощенное уравнение для тройных смесей можно представить в виде

$$\epsilon_{123} = \epsilon_1 + m\epsilon_1\varphi_3 + (\epsilon_3 - m\epsilon_2 - \epsilon_1)\varphi_3^2, \quad (6.26)$$

Таблица 6.13. Значения коэффициентов n уравнения (6.23) для изотерм диэлектрической проницаемости бинарных систем при 25 °С, $\varphi_2=0-1$

Система	n	Система	n
Ацетон-метанол	0.5	Этилацетат - метанол	4.1
Тетрахлорметан - хлороформ	1.0	Хлороформ - ацетон	5.0
Гексан - хлороформ	1.0	Хлороформ - метанол	5.7
Диоксан - хлороформ	1.0	диэтиловый эфир - метанол	6.0
Гексан - этилацетат	1.1	Тетрагидрофуран - вода	6.8
Пропан-2-ол – вода (20 °С)	1.3	Гексан - этанол	7.5
Ацетонитрил - вода	1.4	Бензол - метанол	11.0
Метанол - вода	1.8	Гексан - нитробензол	11.0
Октан-1-ол - метанол	2.0	Гексан - бензонитрил	11.0
Этанол — вода	2.5	Уксусная кислота — вода	19.0
Гексан – пропан-2-ол	3.0	Диоксан — вода	24.0
Ацетон - вода	3.3		

Таблица 6.14. Значения коэффициентов m ур. (6.26) для трехкомпонентных систем при 25°C

Система ($\varphi_3=0-1$)	φ_2	m
Гексан – диоксан — этанол	0.05-0.2	7.5
Гексан – диоксан – этилацетат	0.03-0.5	1.1
Гексан – хлороформ – этанол	0.10	2.5
Гексан – хлороформ – этанол	0.20	4.6
Пропан-2-ол – метанол – вода *	0.05	1.0
Пропан-2-ол – метанол – вода *	0.10	1.3
Пропан-2-ол – метанол – вода *	0.15	1.7
Пропан-2-ол – метанол – вода *	0.20	2.3
Пропан-2-ол – метанол – вода *	0.25	3.2

Примечание: *20°C.

где $\varepsilon_1 \leq \varepsilon_2 \leq \varepsilon_3$, φ_3 – объемная доля наиболее полярного компонента, а m – эмпирический коэффициент.

Если величина ε_1 мало отличается от ε_2 , коэффициенты уравнений (6.23) и (6.26) m и n равны, если ε_1 заметно меньше ε_2 , величина m существенно зависит от φ_2 (табл. 6.14). Проанализируем (6.26) на примере системы пропан-2-ол – метанол – вода, взяв данные из диаграммы в [397]. Подберем оптимальные коэффициенты m для разных концентраций метанола и определим полином, описывающий функцию $m = f(\varphi_2)$. Найдем, что

$$m = 0.9 + 36.1 \varphi_2^2. \quad (6.27)$$

Таким образом, изотерма для данной тройной смеси может быть описана системой из двух эмпирических уравнений (6.26) и (6.27). Эта система уравнений хорошо описывает ε_{123} в диапазоне $\varphi_2=0.05-0.25$. Экстраполяция функции в области $\varphi_2=0$ и $\varphi_2>0.25$ может привести к ошибочным результатам. Аналогичный подход применим к любой трехкомпонентной системе.

6.7. Температура кипения и азеотропные свойства

Температура кипения является одним из важных критериев при выборе оптимальных растворителей для ВЭЖХ. Она должна быть достаточно высокой для предотвращения закипания в головках насо-

са. Паровые пузыри препятствуют работе клапанов насоса. Кроме того, попадание пузырей в ячейку детектора блокирует детектирование. Еще один недостаток легкокипящих жидкостей заключается в том, что при их использовании в многокомпонентных подвижных фазах состав последних нестабилен из-за испарения низкокипящего компонента, что приводит к невоспроизводимости величин удерживания. В случае высокой токсичности или воспламеняемости летучего компонента возникают дополнительные проблемы, обусловленные требованиями техники безопасности лабораторных работ. С другой стороны, если используется не аналитический, а препаративный режим ВЭЖХ, для облегчения выделения образцов из полученных фракций путем испарения подвижной фазы требуется достаточно низкая температура кипения. В препаративной жидкостной хроматографии имеет значение и такое свойство смешанных растворителей, связанное с температурой кипения, как способность образовывать азеотропные смеси. Выделение нелетучих препаратов оптимально проводить азеотропной однократной перегонкой подвижной фазы. Азеотропные смеси выгодны для применения в качестве подвижных фаз и в аналитической хроматографии, поскольку регенерируются простой перегонкой, после чего могут употребляться повторно. Следует отметить, что половина изученных жидких смесей азеотропна, а из используемых в хроматографии жидких смесей азеотропны примерно *три четверти*!

Рассмотрим и обобщим с точки зрения практической ВЭЖХ изменения температуры кипения в зависимости от объемной доли модификаторов в бинарных подвижных фазах и обсудим возможности применения азеотропных смесей в качестве подвижных фаз.

При изучении изобарических кривых состав жидкости выражают в молярных долях или процентах (заданная таким образом концентрация не зависит от температуры и напрямую отражает стехиометрию физико-химических процессов), причем ради единообразия на диаграммах слева направо откладывают концентрацию компонента, имеющего более низкую $T_{кип}$. В работе [398] все данные отнесены к концентрации модификатора в объемных долях при комнатной температуре (20°C). Модификатор, независимо от того, является ли он более или менее летучим, чем разбавитель, фигурирует как второй компонент системы. Предметом рассмотрения в [398]

является не объемный состав жидкости в точке кипения, а $T_{кип}$ которую будет иметь подвижная фаза определенного состава, приготовленная при комнатной температуре, если ее довести до точки кипения. Значения $T_{кип}$ в свою очередь отнесены к атмосферному давлению. Напомним, что в ПФ для НФХ разбавителем служат неполярные растворители или наименее полярный в конкретной паре растворитель. Например, в системе хлороформ – метанол разбавителем является хлороформ. В ОФХ разбавителем ПФ является вода, а в безводных элюентах – более полярный компонент смеси. Так, в смеси метанол – ацетонитрил метанол будет служить разбавителем. Экспериментальные значения $T_{кип}$ бинарных смесей взяли из [399-401], концентрацию модификатора в смеси пересчитали из мольной доли x_2 в объемную долю φ_2 с учетом эффекта сжатия или расширения объема смеси по соотношению (6.28).

$$\varphi_2 = \frac{\rho_{12}}{\rho_2 \{1 + [(1 - x_2) / x_2] M_1 / M_2\}}, \quad (6.28)$$

где x_2 – молярная доля модификатора, ρ_{12} – плотность бинарной смеси, ρ_2 – плотность модификатора, а M_1 и M_2 соответствующие молекулярные массы.

В табл. 6.15 приведены азеотропные смеси, температуры кипения разбавителя (T_1), модификатора (T_2) и азеотропных смесей (T_A). Содержание модификаторов для сравнения выразили в массовых долях (m_2), объемных долях с учетом (φ_2) и без учета эффектов сжатия или расширения смеси ($\varphi_{2адк}$). В азеотропных смесях, применимых в качестве ПФ для НФХ, неаддитивность объемных свойств проявляется незначительно, величины φ_2 и $\varphi_{2адк}$ практически не различаются. В водных азеотропных смесях (ОФХ) эти различия выражены сильнее, однако азеотропные составы находятся в областях φ_2 , в которых отклонения от аддитивности не максимальны. Наиболее сильное сжатие водноспиртовых или воднокетонных смесей 2-5% имеет место в диапазоне $\varphi_2=0.4-0.6$.

Для прогноза температуры кипения бинарной подвижной фазы произвольного состава при оптимизации условий хроматографирования в [398] предложено использовать рациональную функцию (6.29), проходящую через три важнейшие экспериментальные точки T_1 , T_2 и T_A ,

$$T_{12} = \frac{T_1 + [T_2(1 + A + B) - T_1]\varphi_2}{1 + A\varphi_2 + B\varphi_2^2}, \quad (6.29)$$

где T_{12} – температура кипения бинарной подвижной фазы, а T_1 и T_2 – температуры кипения разбавителя и модификатора, φ_2 – объемная доля модификатора. Уравнение (6.29) составлено таким образом, что при $\varphi_2=0$, $T_{12}=T_1$, при $\varphi_2=1$ $T_{12}=T_2$ эмпирические коэффициенты A и B оптимизированы так, что экстремум функции $T_{12}=f(\varphi_2)$ при φ_2 , соответствующей составу азеотропной смеси (φ_A), близок к экспериментальному значению T_A . В табл. 6.16 приведены значения A и B для 21 бинарной системы, по которым можно оценить произвольную величину T_{12} для конкретной подвижной фазы. При нахождении коэффициентов уравнения (6.29) для неазеотропных систем вода – метанол, вода – уксусная кислота и азеотропной системы этанол – вода, у которой T_A мало отличается от T_2 , а φ_A максимально близко смещена к $\varphi_2=1$, использовали экспериментальные изобары из [393]. Следует отметить, что экспериментальные данные по составу, температурам кипения азеотропных смесей, по самому факту азеотропии для тех или иных пар растворителей, а также по измерениям изобар бинарных систем обнаруживают большие расхождения, поэтому иногда достаточно трудно оценить, насколько точно экспериментальные изобары описываются функцией (6.29). В табл. 6.15 внесены только согласованные в двух и более публикациях данные. Сопоставление расчетных значений T_{12} с экспериментальными T_{12} показывает, что в целом функции типа (6.29) неплохо аппроксимируют эмпирические изобары ($R=0.999-0.910$), как правило, лучше, чем полиномы 2-й или 3-й степени, особенно для систем, у которых экстремум сильно удален от эквиобъемного состава. Во всем диапазоне $\varphi_2=0-1$ уравнение (6.29) хорошо описывает экспериментальные изобары для систем вода – этанол, вода – метанол, вода – уксусная кислота, этилацетат – метанол. Для систем гексан – хлороформ, бензол – метанол, вода – ацетонитрил уравнение (6.29) адекватно аппроксимирует восходящую ветвь изобары (диапазоны φ_2 равные 0.60-1 0.30-1 и 0.82-1 соответственно). В системах циклогексан – этилацетат, гексан – пропан-1-ол, хлороформ – метанол, наоборот, оно точнее описывает нисходящую ветвь изобары (диапазоны φ_2 равные 0-0.40, 0-0.26 и 0-0.35 соответственно). По всей видимости, для многих азеотропных систем уравнение (6.29), позволяя точно охарактеризовать эк-

Таблица 6.15. Составы и температуры кипения азеотропных бинарных смесей, служащих подвижными фазами

№	Система	T_1	T_2	T_A	m_2	φ_2	$\varphi_{2,аз}$
1	Циклогексан – 1,4-диоксан	80.8	101.3	79.5	0.75	0.692	0.698
2	Циклогексан – 1,2-дихлор-этан	80.8	57.3	75	0.50		0.384
3	Циклогексан – пропан-1-ол	80.8	97.3	75	0.19		0.185
4	Циклогексан – этилацетат	80.8	77.1	71.6	0.44	0.399	0.404
5	Гексан – пропан-1-ол	68.8	97.3	66	0.04	0.032	0.033
6	Гексан – пропан-2-ол	68.8	82.4	63	0.23	0.197	0.200
7	Гексан – бутан-1-ол	68.8	117.7	68	0.03		0.025
8	Гексан – <i>трет</i> -бутанол	68.8	82.4	64	0.22		0.192
9	Гексан – этанол	68.8	78.3	58	0.21	0.179	0.182
10	Гексан – ТГФ	68.8	65.7	63	0.54	0.459	0.465
11	Гексан – 1,4-диоксан	68.8	101.3	Неазеотропна			
12	Гексан – хлороформ	68.8	61.2	60	0.72	0.529	0.532
13	Гексан – 1,2-дихлорэтан	68.8	57.3	Неазеотропна			
14	Гептан – 1,4- диоксан	98.4	101.3	91.9	0.56	0.452	0.457
15	Дихлорметан – метанол	40.0	64.7	38	0,07		0,112
16	Бензол – метанол	80.1	64.7	58	0.39	0.416	0.416
17	Диэтиловый эфир – метанол	34.6	64.7	Неазеотропна			
18	Хлороформ – метанол	61.2	64.7	53	0.13	0.219	0.220
19	Этилацетат – метанол	77.1	64.7	62	0.49	0.523	0.523
20	ТГФ – метанол	65.7	64.7	59.1	0.69	0.715	0.714
21	Метанол – ацетонитрил	81.6	64.7	63	0.81	0.814	0.814
22	Вода – ацетон	100	56.4	56	0.88	0.919	0.903
23	Вода – бутанон	100	79.8	73	0.89		0.910
24	Вода – пропан-1-ол	100	97.3	88	0.87		0.815
25	Вода – пропан-2-ол	100	82.4	80	0.88	0.913	0.903
26	Вода – уксусная кислота	100	118	Неазеотропна			
27	Вода – этанол	100	78.3	78.2	0.96	0.981	0.968
28	Вода – 1,4-диоксан	100	101.3	88	0.82	0.820	0.816
29	Вода – ацетонитрил	100	81.6	77	0.84	0.878	0.871
30	Вода – <i>трет</i> -бутанол	100	82.4	80	0.88		0.904
31	Вода – ТГФ	100	65.7	63.5	0.82	0.840	0.834
32	Вода – метанол	100	64.7	Неазеотропна			
33	Вода – ДМФА	100	153.0	Неазеотропна			
34	Вода – этиленгликоль	100	197.8	Неазеотропна			

спериментальные значения T_{12} вблизи экстремума, без систематических отклонений можно описать только одну ветвь изобары, что не мешает использовать его для априорных расчетов с прикладными целями. На рис. 6.19 приведены некоторые примеры экспериментальных изобар, совмещенных с кривыми, построенными по уравнению (6.29).

Установление связи между свойствами индивидуальных растворителей и образуемых ими смесей, в частности, азеотропных, считается одной из главных задач теории растворов [400]. Для систем, образованных полностью смешивающимися веществами, а именно такие используются в жидких ПФ, общей закономерностью является то, что чем больше различаются компоненты по химической природе и чем ближе их температуры кипения, тем более вероятно образование азеотропных систем.

В первую очередь, отклонения от закона Рауля, приводящие к азеотропии, обусловлены соотношением полярностей растворителей [400-401].

В [398] установлены два правила. Для измерения полярности применили один из обобщенных тернарных критериев полярности P^0 .

Концентрация модификатора в азеотропной подвижной фазе для НФХ тем выше, чем выше ее суммарная полярность. Это правило соблюдается как для малополярных подвижных фаз, разбавителем в которых служит неполярный углеводород (рис. 6.20, линия I, $P^0_{\text{сум}} =$

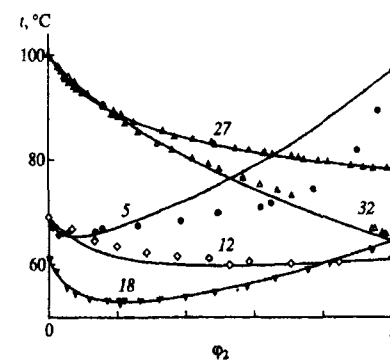


Рис. 6.19. Наблюдаемые изобары для бинарных систем № 5, 12, 18, 27, 32 (табл. 6.15.), совмещенные с кривыми, построенными по уравнению (6.29)

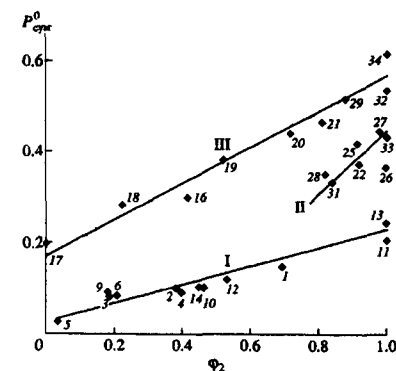


Рис. 6.20. Корреляции суммарной полярности бинарных азеотропных систем от объемной доли модификатора; системы типа углеводород – модификатор (I), вода-модификатор (II), разбавитель – метанол (до № 20 включительно) (III). Номера систем см. в табл. 6.15.

$= 0.036 + 0.181 \varphi_A$, $R=0.963$), так и для полярных фаз, содержащих в качестве модификатора метанол (линия III, $P_{\text{сум}}^0 = 0.184 + 0.377 \varphi_A$, $R=0.977$). При достижении определенного предела в величине суммарной полярности азеотропия отсутствует. Таким образом, при использовании в качестве неполярного разбавителя гексана, гептана, изооктана или циклогексана (алкана или циклоалкана) не удастся получить азеотропные смеси с полярностью $P_{\text{сум}}^0 \geq 0.23$. При использовании системы разбавитель – метанол азеотропия отсутствует при величине $P_{\text{сум}}^0$, соответствующей полярности чистого метанола.

Концентрация модификатора в азеотропной подвижной фазе для ОФХ, наоборот, тем выше, чем меньше суммарная полярность (линия азеотропов II, $P_{\text{сум}}^0 = -0.141 + 0.586 \varphi_A$, $R=0.923$ и фрагмент линии метанольных азеотропов III). Оказалось, что модификаторы с полярностью, как у чистого метанола и выше, не способны образовывать с водой азеотропных смесей (2-аминоэтанол, этиленгликоль, пропандиолы). Не создают с водой азеотропы и менее полярные растворители – уксусная кислота и ДМФА. По-видимому, это связано с характером изменения водородных связей при смешении с водой данных растворителей. Это, как правило, сильно ассоциированные растворители с Н-связью или апротонные высокодипольные растворители (ДМФА, ДМСО).

Если рассмотреть влияние полярности модификатора на состав азеотропа в системах с общим разбавителем, например, гексан – модификатор (НФХ) или вода – модификатор (ОФХ), нетрудно заметить, что с увеличением полярности модификатора его доля в азеотропной нормально-фазовой смеси уменьшается, стремясь к $\varphi_2=0$, и увеличивается в ОФХ, стремясь к $\varphi_2=1$. По сути дела, в [398] найдены оригинальные *полиазеотропные системы*. Классические полиазеотропные системы – это серия азеотропов, у которых один компонент общий, а другим компонентом являются члены гомологического ряда. Обычно они строятся в системе координат $\lg(x_2) - T_A$ [399-401].

Результаты приведенных выше исследований позволяют сделать ценный практический вывод, что, варьируя тип модификатора и разбавителя, становится возможным подобрать такую азеотропную ПФ, которая будет иметь суммарную полярность, оптимальную по эффективности и селективности для хроматографического разделения кон-

Таблица 6.16. Значения коэффициентов A и B уравнения (6.29) для бинарных систем

СИСТЕМА	A	B
Циклогексан – 1,4-диоксан	-0.9495	-0.0363
Циклогексан – этилацетат	3.625	-0.809
Гексан – пропан-1-ол	26.45	-9.96
Гексан – пропан-2-ол	5.785	-2.218
Гексан – этанол	14.98	-5.51
Гексан – ТГФ	2.08	-0.408
Гексан – хлороформ	5.12	-0.515
Гептан – 1,4- диоксан	0.352	-0.343
Бензол – метанол	7.592	-2.185
Хлороформ – метанол	10.745	-3.139
Этилацетат – метанол	4.621	-0.899
ТГФ – метанол	-0.603	-0.219
Ацетонитрил – метанол	47.89	-3.08
Вода – этанол	4.73	0.25
Вода – ацетон	0.208	-0.883
Вода – пропан-2-ол	-0.619	-0.302
Вода – 1,4-диоксан	-0.766	-0.197
Вода – ацетонитрил	-0.521	-0.386
Вода – ТГФ	0.196	-0.775
Вода – метанол	13.1	6.203
Вода – уксусная кислота	-0.891	0.0001

кретной смеси сорбатов, а также приемлемую для имеющегося оборудования $T_{\text{кип}}$. Азеотропные элюенты для НФХ могут содержать от 3 до 70% модификатора, а водные азеотропные ПФ для ОФХ могут содержать не более 30% органического модификатора. В табл. 6.17 приведены некоторые примеры вероятных областей приложения азеотропных смесей в ВЭЖХ, почерпнутые из анализа суммарных полярностей ПФ, нашедших применение в хроматографическом разделении различных классов органических соединений, использующихся в технологиях тонкого органического синтеза, биохимии, медицине и пищевой химии. Широкие дополнительные возможности в ус-

Таблица 6.17. Возможные области применения азеотропных ПФ

Класс соединений	$R'_{\text{сум}}$ используемых ПФ	Эквиполярные азеотропные ПФ (табл. 6.15)
Антибиотики – аминогликозиды	0.10-0.22 (НФХ, ОФХ)	1, 2, 4, 10, 12, 14
Барбитураты	0.02-0.03 (НФХ)	5, 7
Витамины группы А	0.02-0.06 (НФХ) 0.46-0.58 (ОФХ)	2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 12, 14 21, 24, 29
Витамины группы Е	0.02-0.13 (НФХ) 0.54-0.58 (ОФХ)	2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 12, 14 нет
Витамины группы Д	0.02-0.23 (НФХ) 0.23-0.56 (ОФХ)	2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 12, 14 18, 20, 21, 24, 25, 27, 28, 29
Каротиноиды	0.02-0.10 (НФХ) 0.40-0.60 (ОФХ)	2, 3, 4, 5, 7, 9, 10 20, 21, 24, 25, 27, 28, 29
Гормональные препараты стероидного типа	0.03-0.22 (НФХ) 0.63-0.89 (ОФХ)	2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 12, 14 нет
Липиды	0.02-0.22 (НФХ) 0.49-0.58 (ОФХ)	2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 12, 14 29
Производные пурина	0.35-0.87 (ОФХ)	19, 20, 21, 22, 21, 25, 27, 28, 29, 30
Цветобразующие компоненты фотоматериалов	0.02-0.10 (НФХ)	2, 3, 4, 5, 7, 9, 10

пешном применении азеотропных ПФ следует ожидать при варьировании типа и свойств хроматографических колонок (НФ).

Таким образом, при оптимизации качественного и количественного состава подвижной фазы при разработке рутинных методик анализа полезно учитывать температуру кипения и способность образовывать азеотропные смеси в области составов, имеющих суммарную полярность, обеспечивающую оптимальную элюирующую силу в конкретной хроматографической системе.

Применение азеотропных ПФ особенно перспективно для массовых анализов и для препаративной ЖХ, так как многократное применение подвижной фазы после простой перегонки существен-

но снизит стоимость одного анализа или препаратов, получаемых хроматографическим разделением.

6.8. Способность растворять аналиты

Растворимость пробы является одним из важнейших признаков пригодности данной подвижной фазы при решении конкретной хроматографической задачи. Особенно остро стоит проблема растворимости в случае препаративного разделения, когда концентрация аналита в исходном растворе на 2-3 порядка выше, чем в условиях аналитической хроматографии.

Если в последнем случае концентрация образца обычно составляет от $1 \cdot 10^{-4}$ до 1%, то в препаративной ЖХ она может достигать до 10-20%. Образец не обязательно растворяют в смеси растворителей, формирующих подвижную фазу. Проба может представлять раствор анализируемой смеси в ином растворителе, чем подвижная фаза. Необходимо, чтобы и аналит, и растворитель хорошо растворялись в элюенте, а сигнал растворителя не накладывался или не экранировал полностью сигнал анализируемого образца. При плохой растворимости образца в элюенте, он может выпасть в осадок в насосе, инжекторе, в капиллярах или в голове колонки, как только вводимый раствор станет достаточно разбавленным подвижной фазой. Это может потребовать демонтажа узлов системы, замены колонки, если образец нельзя будет растворить *in situ*. Для того чтобы избежать этих проблем, исследуйте, как влияет на раствор образца разбавление подвижной фазой, с помощью пробного эксперимента *до проведения* разделения на приборе.

Если образец плохо растворим или не может быть растворен непосредственно в элюенте, а подвижной фазой является смесь двух или большего числа растворителей, необходимо растворить образец в одном из растворителей и затем разбавить этот раствор другими растворителями настолько, насколько это возможно для того, чтобы максимально затем приблизиться или воспроизвести подвижную фазу по составу и элюирующей силе. Поскольку осадок может выпасть не сразу, следует подождать определенное время.

В связи с тем, что практических полуколичественных определений растворимости образца простыми приемами обычно оказыва-

ется достаточно, в монографиях по ЖХ влияние состава бинарных или многокомпонентных элюентов на растворимость сорбатов не рассматривается. Вместе с тем это влияние выражено сильно и только сложность теории растворов, и трудоемкость экспериментальных измерений удерживает хроматографистов от детального изучения этого вопроса. Ниже обратим ваше внимание на некоторые теоретические аспекты и наблюдаемые тенденции, связанные со способностью бинарных смесей растворять сорбаты.

Первое эмпирическое правило, учитывающее наличие сил взаимодействия между растворителем и растворенным веществом, известное нескольких столетий, гласит, что “подобное растворяется в подобном” (*similia similibus solvuntur*). Под понятием “подобный” подразумевается в первую очередь наличие сходных функциональных групп в молекулах. Однако это правило имеет немало исключений, когда различные по своей химической природе соединения взаимно растворимы. Так, при комнатной температуре смешиваются в любых отношениях метанол и бензол, вода и диметилформамид, анилин и диэтиловый эфир, полистирол и хлороформ. С другой стороны, некоторые близкие по химической природе вещества не образуют растворы. Так, поливиниловый спирт не растворяется в этаноле, ацетилцеллюлоза – в этилацетате, а полиакрилонитрил – в акрилонитриле [345].

При растворении электролитов вокруг каждой молекулы или иона образуется оболочка из более или менее прочно связанных молекул растворителя. Это явление называется *сольватацией*. Движущей силой сольватации являются межмолекулярные взаимодействия между растворенным веществом и растворителем. Особенно сильно влияют на молекулы растворителя ионы электролита. В процессах сольватации имеет значение стехиометрия сольватных комплексов (число молекул растворителя на один ион), скорость обмена сольватированных молекул с несольватированными, структуризация сольватной оболочки. Описание сольватации ионов и молекул в смесях растворителей – нетривиальная задача. В этом случае помимо взаимодействий между растворителями и растворенным веществом большую роль играет и взаимодействие между молекулами различных растворителей. Взаимодействием последнего типа обусловлено,

в частности, существенное отклонение реального давления пара бинарных смесей растворителей от давления пара идеальной жидкости, описываемого законом Рауля. Изучение сольватации ионов и биполярных молекул в бинарных смесях растворителей показало, что отношение содержания индивидуальных растворителей в сольватной оболочке может отличаться от их отношения в смеси растворителей. В окружении частиц растворенного вещества преимущественно концентрируется компонент смеси, обуславливающий более отрицательную энергию Гиббса сольватации $\Delta G^{\circ}_{\text{сольв}}$. Тот факт, что состав сольватной оболочки отличается от состава раствора в целом, получил название *селективной* или *избирательной сольватации*. Обычно этими терминами пользуются для описания индуцированной растворенным веществом молекулярно-микроскопической негомогенности многокомпонентной смеси растворителей. Избирательная сольватация включает как неспецифическую ассоциацию молекул растворенного вещества и растворителя, обусловленную электростатическими взаимодействиями молекул сольватной оболочки с ионами или биполярными молекулами находящимися в растворе, так и специфические взаимодействия молекул растворителя и растворенного вещества, например, образование водородных связей.

Если оба иона бинарной соли, находящейся в смеси двух растворителей, преимущественно сольватируются одним и тем же растворителем, то такое явление называют *гомоселективной сольватацией*. Предпочтительная сольватация катиона одним растворителем, а аниона – другим ведет к *гетероселективной сольватации*. Так, в растворе нитрата серебра в бинарной подвижной фазе ацетонитрил – вода наблюдается преимущественная сольватация Ag^+ ацетонитрилом и NO_3^- водой (гетероселективная сольватация). Напротив, в растворах хлорида кальция в водном метаноле как Ca^{2+} , так и Cl^- сольватируются преимущественно молекулами воды (гомоселективная сольватация) [345]. Различным образом сольватированные ионы называют *сольватомерами*. Избирательная сольватация наблюдается не только для растворов электролитов в многокомпонентных смесях растворителей. Даже для биполярных неэлектролитов состав сольватной оболочки может отличаться от состава растворителя. При определенном соотношении компонентов бинарной смеси растворителей оба растворителя в равной мере

участвуют в создании первой сольватной оболочки. Такой состав растворителя называют *точкой эквисольватации* или *изосольватации*.

Наличие разных условий для сольватации, конкуренция между компонентами растворителя приводит к тому, что растворимость образца может резко отличаться в зависимости от состава бинарной смеси. Подбор компонентов смешанного растворителя позволяет в большинстве случаев обеспечить направленную сольватацию участников хроматографического процесса, протекающего с участием этого растворителя. Большей частью это достигается сочетанием сольватоактивных растворителей с относительно сольватионертными. Очевидно, что в смеси диметилсульфоксид – тетрахлорметан специфическая сольватация растворенной в этом растворителе кислоты во всем интервале концентраций, за исключением 100%-го тетрахлорметана, будет осуществляться диметилсульфоксидом. В системе хлорбензол – муравьиная кислота сольватация растворенного в нем электронодонорного соединения будет осуществляться исключительно муравьиной кислотой. Выбор диэлектрической проницаемости разбавителя позволяет направленно управлять универсальной сольватацией в подвижной фазе и добиваться оптимальной растворимости анализов.

Для оценки растворимости неэлектролитов в органических растворителях часто используют параметр растворимости Гильдебранда δ_r . У хорошего растворителя для неэлектролитов параметр δ_r , как правило, близок δ_r растворяемого вещества. Смесь двух растворителей, один из которых имеет более высокое, а другой более низкое значение параметра δ_r , по сравнению с растворенным веществом, является лучшим растворителем, чем любой из двух растворителей в чистом виде. Растворимость неэлектролитов снижается при добавлении солей. Этот эффект, известный под названием *высаливания*, используется на практике для выделения органических веществ из растворов. Эффект высаливания крайне нежелателен при работе с буферными растворами. В присутствии растворенных диссоциированных солей часть молекул растворителя вовлекается в сольватационное взаимодействие с ионами электролита, что приводит к снижению активности молекул растворителя и к высаливанию растворенного неэлектролита. Другими словами, высаливание можно рас-

сматривать как проявление различной растворимости неэлектролита в двух растворителях – не содержащем ионы и содержащем ионы.

Неэлектролиты с высоким значением гидрофобности $H=10-45$ ($\log P > 5$) могут плохо растворяться и в полярных растворителях (в воде, спиртах и ацетонитриле), и в неполярном гексане. Их растворимость обычно возрастает при добавлении в гексан 10-20% сложных или простых эфиров, а элюирующую способность можно регулировать добавлением третьего компонента, например, небольшой доли изопропилового спирта.

При растворении полимеров следует учитывать лиофильные свойства мономерного звена, наличия функциональных групп, имеющих повышенное сродство с тем или иным растворителем. Если имеют дело с сополимерами, используют смеси селективных растворителей. При несбалансированном соотношении растворителей и неоптимального температурного режима наблюдается мицеллообразование. Ядро мицелл будет состоять из нерастворимых в данной среде блоков полимера, а внешняя оболочка – из растворимых. Повышение молекулярной массы любого блока приводит к понижению критической концентрации мицеллообразования. При растворении полимеров ориентируются на параметр растворимости Гильдебранда. Так, если сополимер получен на основе полибутадиена, полиизопрена и полистирола, δ_r которых составляет соответственно 17.0, 16.6 и 18.7 МПа^{1/2}, растворители должны иметь параметр растворимости в пределах 16.4 – 20.5 МПа^{1/2}. Истинные растворы сополимеры образуют только с 4 растворителями (тетрахлорметаном, бензолом, бутилацетатом и толуолом, растворимости которых наиболее близки (17.4-19.9 МПа^{1/2}).

6.9. Полярность и элюирующая способность

Понятие об элюотропных рядах ввел в 1940 г. Траппе [367]. В элюотропном ряду растворители расположены в порядке увеличения элюирующей силы. Последовательность растворителей изменяется в зависимости от того, на каких сорбентах определяется их элюирующая способность. В условиях НФХ более полярные растворители обладают пропорционально большей элюирующей силой. В ОФХ,

наоборот, вода обладает низкой элюирующей силой, а элюирующая сила элюента обратно пропорциональна полярности органического модификатора, используемого в смешанной подвижной фазе. В настоящее время имеются надежные элюотропные ряды чистых растворителей для всех основных сорбентов. Нет еще полной ясности с точным определением элюирующей способности смесей растворителей, несмотря на то, что составлено большое количество элюотропных рядов для бинарных смесей. Влияние состава смешанного растворителя на его эффективную элюирующую силу в целом носит сложный характер. Часто элюирующую способность определяют при различной активности сорбентов. Сопоставление элюотропных рядов полученных таким образом неправомерно. Существует проблема “грязных” растворителей. Наличие примесей в растворителе может привести к заметному искажению элюирующей силы смешанной ПФ, приготовленной из такого растворителя. Это особенно характерно для самого полярного из всех растворителей – воды. Поэтому содержание воды в ПФ и степень покрытия водой неподвижной фазы являются очень важными параметрами в адсорбционной НФХ. Помимо значительного уменьшения времени удерживания, следствием добавления воды к ПФ может быть также улучшение формы пика, повышение эффективности колонки и улучшение воспроизводимости результатов.

6.9.1. Влияние состава в нормально-фазовой хроматографии

В связи с тем, что элюирующая сила определяется не только природой растворителей, но и механизмом разделения на разных сорбентах, рассмотрим вначале ситуацию для НФХ на силикагеле и оксиде алюминия. В общем случае элюирующая сила бинарных и многокомпонентных подвижных фаз лежит в интервале соответствующих значений чистых компонентов. В то же время, элюирующая сила смешанного растворителя неаддитивно меняется в зависимости от объемной доли модификатора, особенно заметны отличия от аддитивности как раз в случае адсорбционной НФХ. Даже незначительное увеличение полярного модификатора приводит к первоначально резкому увеличению элюирующей силы, затем это увеличе-

ние изменяется более монотонно. Из рис.6.22. видно, что изотермы $\epsilon''_{12} - \varphi_2$ представляют собой кривые насыщения. При этом соблюдается тенденция – чем больше элюирующая сила модификатора, тем резче и выше скачок элюирующей способности при его добавлении к разбавителю, т.е. “насыщение” элюирующей силой происходит при добавлении меньших объемов модификатора в разбавитель.

Впервые зависимость элюирующей силы смеси растворителей от ее состава была изучена Снайдером. Им же было предложено уравнение для расчета эффективной элюирующей силы смеси двух растворителей по известным значениям силы каждого из них.

$$\epsilon''_{12} = \epsilon''_1 + (1/\alpha n_2) \lg [N_2 10^{\alpha n_2 (\epsilon''_2 - \epsilon''_1)} + 1 - N_2], \quad (6.30)$$

где ϵ''_{12} – элюирующая способность бинарной подвижной фазы, ϵ''_1 и ϵ''_2 – элюирующая способность разбавителя и полярного модификатора; α – активность НФ, n_2 – площадь, необходимая для размещения молекулы модификатора на поверхности, а N_2 – мольная доля модификатора. Это уравнение демонстрирует связь элюирующей способности элюента с размерами молекул модификатора, конкурирующего с молекулой сорбата в хроматографическом процессе, а также с мольной долей модификатора и с хроматографическими свойствами сорбента.

Для тернарной ПФ, пользуясь теоретическими выкладками Снайдера, в основе которых лежит представление о конкурентной адсорбции нескольких молекул на одних и тех же центрах однородной поверхности и некоторыми упрощениями (предполагается использовать среднюю площадь молекулы модификатора и считать ее примерно равной площади молекулы сорбата), можно вывести следующее уравнение [63]

$$\epsilon''_{123} = \epsilon''_1 + (1/\alpha n_{23}) \lg [N_2 10^{\alpha n_{23} (\epsilon''_2 - \epsilon''_1)} + 10 N_3^{\alpha n_{23} (\epsilon''_3 - \epsilon''_1)} + 1 - N_2 - N_3], \quad (6.31)$$

где ϵ''_{123} – элюирующая способность тернарной подвижной фазы, ϵ''_2 и ϵ''_3 – элюирующая способность наиболее полярных компонентов; α – активность НФ, n_{23} – средняя площадь молекул компонентов, а N_2 и N_3 – их мольные доли.

Уравнения (6.30) и (6.31) хорошо аппроксимируют экспериментальные значения суммарной ϵ'' , если разбавитель и модификатор не слишком резко отличаются по полярности, если силикагель не слишком насыщен влагой. Наибольшие отклонения наблюдаются

для систем неполярный разбавитель (пентан, гексан и т.п.) и полярный модификатор (ацетонитрил, спирты), особенно при низких концентрациях модификатора (<5% об.). Причиной этих искажений является эффект локализации растворителя. Согласно модели, описываемой уравнением (6.30), ни для одного типа молекул (разбавителя или модификатора) не наблюдается преимущественной адсорбции на поверхности, а имеет место адсорбция этих молекул в монослое в соответствии со статистическим распределением. На самом деле, полярные молекулы модификатора локализуются на более “активных” центрах. Эти центры становятся менее доступными для обменных процессов с молекулами хроматографируемого вещества. В результате элюирующая способность оказывается выше, чем рассчитанная в соответствии с предположением о совершенно “равноправной” адсорбции растворителей. При концентрациях модификатора, превышающих 5%, эффекты локализации прекращаются. Соответственно, уменьшается и величина ошибки $\Delta \epsilon'_{12}$. Применяя довольно сложную и трудоемкую процедуру [252], можно рассчитать правильные значения ϵ'_{12} для любой бинарной смеси. Для каждой пары растворителей проводят два расчета. На практике значения ϵ'_2 зависят от концентрации модификатора, а не являются постоянными. Эти скорректированные величины ϵ'_2 следует подставлять в уравнении (6.30), причем расчеты проводятся для каждого соотношения растворителей *A* и *B*. В табл. 6.18 приведены примеры отклонения экспериментальной элюирующей силы от расчетной по (6.30), а в табл. 6.19. представлены параметры, необходимые для расчета ϵ'_{12} . Значения ϵ' получены для параметра активности $\alpha=1$. При других активностях значения элюирующей силы чистого растворителя будет отличаться от показанных в табл. 6.19. Величина $1/V_m$ нужна для расчета мольной доли N_2

$$N_2 = [\varphi_2(1/V_2)] / [\varphi_2(1/V_2) + \varphi_1(1/V_1)] \quad (6.32)$$

Среднюю величину n_2 в расчетах часто принимают равной 5. Эта величина мало влияет на полученные значения суммарной ϵ' . Расчеты истинных ϵ' для бинарных и многокомпонентных подвижных фаз проводить “вручную” сложно, они включают итерационные стадии. Поэтому результаты расчетов по уравнениям типа (6.30) и (6.31) будут носить приблизительный характер. Это приемлемо больше для

тонкослойной хроматографии, где большая точность прогноза ϵ' менее важна, чем для ВЭЖХ. В общем-то, данные табл. 6.19. применимы преимущественно для ТСХ на оксиде алюминия, так как ориентированы, в первую очередь, на данный сорбент. При оценке ϵ'_{12} на силикагеле Гейсс рекомендует принимать активность $\alpha=0.7$, $n_2=10$ [252].

Уравнение (6.30) при $N_2 > 0.2$ и $\alpha(\epsilon'_2 - \epsilon'_1) > 0.2$, как показано в [252], преобразуется в более простое выражение (6.33), которое часто хорошо описывает экспериментальные данные.

$$\lg \epsilon'_{12} = \lg \epsilon'_2 + (\lg N_2) / \alpha n_2 \quad (6.33)$$

В то же время следует признать, что уравнением Снайдера пользоваться в рутинной работе не удобно. Достаточно сказать, что концентрация компонентов подвижной фазы дозируется в объемных соотношениях, экспериментальные значения ϵ'_{12} , как показано выше, могут существенно отклоняться от рассчитанных по (6.30) из-за эффектов локализации полярного растворителя у поверхности сорбента. Поэтому в литературе приводятся номограммы для быстрого прогноза элюирующей силы разных составов (рис.6.21) или таблицы элюотропных серий (табл. 6.20. – 6.22).

Данные об элюирующей силе смесей нужны, прежде всего, для поиска изоэлюотропных составов ПФ. *Изоэлюотропные подвижные фазы* – ПФ, которые отличаются друг от друга качественным и количественным составом растворителей, но имеют одинаковую

Таблица 6.18. Ошибка в определении величины ϵ'_{12} по уравнению (6.30) [252]. Растворитель *A* – гептан; адсорбент – оксид алюминия; цифры в скобках – значения для силикагеля

Растворитель <i>B</i>	$\Delta \epsilon'_{12}$ при содержании <i>B</i> , % (об.)				
	1	2	5	10	25
Диизопропиловый эфир	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01
Диэтиловый эфир	0.02(0.09)	0.03(0.12)	0.05 (0.13)	0.05 (0.11)	0.03 (0.05)
ТГФ	0.10	0.09	0.06	0.03	0.00
Ацетонитрил	0.23	0.23	0.19	0.13	0.04
Ацетон	0.15	0.13	0.09	0.04	0.01
Диэтиламин	0.22	0.18	0.11	0.05	0.01
Этилацетат	0.07(0.14)	0.06(0.14)	0.02(0.11)	0.01(0.07)	0.00 (0.02)
Диоксан	0.05	0.02	0.00	0.00	0.00
Пиридин	0.03	0.01	0.00	0.00	0.00

Таблица 6.19. Параметры растворителей для расчета ϵ'_{12} на оксиде алюминия и силикагеле по ур. (6.30). Обозначения: *A* – оксид алюминия; *C* – силикагель, ϵ'_2 – скорректированная элюирующая сила при очень низких концентрациях растворителя (близких к 0) в пентане [252]

Растворитель	Адсорбент	ϵ'	ϵ'_2	n_2	$1/V_m$ моль/см ³
Изооктан	A/C	0.01	0.01	7/6	0.63
Гептан	A/C	0.01	0.01		0.68
Гексан	A/C	0.01	0.01		0.77
Пентан	A/C	0.00	0.00	5.9	0.87
Циклогексан	A	0.04	0.04	6.0	0.93
Дисульфид углерода	A	0.15	0.15	3.7	1.66
Тетрахлорметан	C	0.11	0.11	5.0	1.04
Дибутиловый эфир	A	0.17	0.17		0.59
Этилиодид	A	0.25	0.25		1.24
<i>n</i> -Ксилол	A	0.26	0.26	7.6	0.81
1-Хлорпентан	A	0.26	0.26	4.2	0.82
1-Хлорбутан	A	0.26	0.26		0.96
Диизопропиловый эфир	C	0.28	0.28	5.1	0.71
Изопропилхлорид	A	0.29			1.09
Толуол	A	0.30	0.30	6.8	0.94
Хлорбензол	A	0.31	0.31	6.7	0.98
Бензол	A	0.32	0.32	6.0	1.13
	C	0.25	0.25	6.0	
Этилбромид	A	0.38		3.4	1.31
	A	0.38	0.50	4.5	0.96
Диэтиловый эфир	C	0.43	0.78	4.5	
Хлороформ	A	0.36	0.36	5.0	1.26
Фторбензол	A	0.40	0.40	5.0	1.07
1,2-Дихлорэтан	A	0.44	0.47	4.8	1.57
	C	0.32		4.8	
Метилэтилкетон	A	0.51		4.6	1.12
ТГФ	A	0.51	0.76	5.0	1.23
	C		1.0		
Нитропропан	A	0.53			1.12
Ацетонитрил	A	0.55	1.31	3.1	1.50

продолжение таблицы 6.19.

Растворитель	Адсорбент	ϵ'	ϵ'_2	n_2	$1/V_m$ моль/см ³
Ацетон	A	0.58	1.01	4.2	1.36
	C	0.5	1.1	4.2	
Этилацетат	A	0.60	0.77	4.5	1.02
	C	0.48	0.94		
3-Метилбутан-1-ол	A	0.61			0.92
Диоксан	A	0.61	0.79	6.0	1.17
	C	0.6	1.0		
Нитроэтан	A	0.61			1.85
Анилин	A	0.62		6.7	1.10
ДМСО	A	0.62		4.3	1.40
Нитрометан		0.64		3.8	1.85
Пиридин	A	0.70	0.95	5.8	1.24
<i>трет</i> -Бутанол	A	0.70			
Диэтиламин	A	0.71	1.8	7.5	0.97
Бутилцеллозольв	A	0.74		6.3	0.77
Пропан-1-ол	A	0.82		8.0	1.34
Пропан-2-ол	A	0.82		8.0	1.34
Этанол	A	0.88		8.0	1.71
Метанол	A	0.95		8.0	2.47
Этиленгликоль	A	1.11		8.0	1.80
Уксусная кислота	A/C	≥1		8.0	1.75

элюирующую силу в выбранной хроматографической системе. Концепция изоэлюотропных ПФ была разработана в связи с необходимостью быстрого прогноза, на какую смесь растворителей можно заменить испытанную ПФ, чтобы получить практически такую же элюирующую способность по отношению к одним компонентам анализируемой смеси, но большую или меньшую по отношению к другим компонентам. Играя на различии специфических взаимодействий между сорбатами, сорбентом и подвижной фазой удастся, в конечном счете оптимизировать разделение.

Можно выделить несколько причин, по которым возникает задача подбора изоэлюотропного состава:

- 1) изменить селективность хроматографической системы для увеличения разрешения, заменяя один сильный растворитель на другой, сохраняя элюирующую способность неизменной;
- 2) улучшить растворимость компонентов пробы в подвижной фазе; повысить чувствительность детектирования;
- 3) улучшить технико-эксплуатационные показатели методики разделения (уменьшить стоимость расходуемых материалов, понизить уровень их пожароопасных и токсикологических свойств и т.п.)

Рассмотрим номограмму Саундерса (рис.6.21). На верхней оси отложены значения элюирующей силы. Все остальные горизонталь-

Таблица 6.20. Пример элюотропных рядов для адсорбционной хроматографии на силикагеле, концентрация модификатора дана в % об. [130]

ϵ^o	A	B	B
0.00	Пентан	Пентан	Пентан
0.05	4.2% изопропилхлорида в пентане	3% CH_2Cl_2 в пентане	4% бензола в пентане
0.10	10% изопропилхлорида в пентане	7% CH_2Cl_2 в пентане	11 % бензола в пентане
0.15	21% изопропилхлорида в пентане	14% CH_2Cl_2 в пентане	26% бензола в пентане
0.20	4% диэтилового эфира в пентане	26% CH_2Cl_2 в пентане	4% этилацетата в пентане
0.25	11% диэтилового эфира в пентане	50% CH_2Cl_2 в пентане	11 % этилацетата в пентане
0.30	23% диэтилового эфира в пентане	82% CH_2Cl_2 в пентане	23% этилацетата в пентане
0.35	56% диэтилового эфира в пентане	3% ацетонитрила в бензоле	56% этилацетата в пентане
0.40	2% метанола в диэтиловом эфире	11% ацетонитрила в бензоле	
0.45	4% метанола в в диэтиловом эфире	31% ацетонитрила в бензоле	
0.50	8% метанола в диэтиловом эфире		
0.55	20% метанола в диэтиловом эфире	Ацетонитрил	
0.60	50% метанола в диэтиловом эфире		

ные отрезки отвечают конкретным бинарным смесям указанного состава. Масштаб на этих отрезках, в соответствии с уравнением (6.30), нелинейный. Допустим, при использовании смеси, состоящей из 50% диэтилового эфира гексана, получают удовлетворяющее исследователя значение элюирующей способности ($\epsilon^o=0.30$). В этом случае может быть применена любая система растворителей, попадающая на пересечение с штриховой линией, которая проведена через точку $\epsilon^o=0.30$. Это смеси 75% метиленхлорида в гексане, 1.7% ацетонитрила в изопропилхлориде, 0.2% метанола в изопропилхлориде.

Аналогично выбрать изоэлюотропные смеси можно по табл.6.18-6.21. Используя одну из этих смесей, можно получить же-

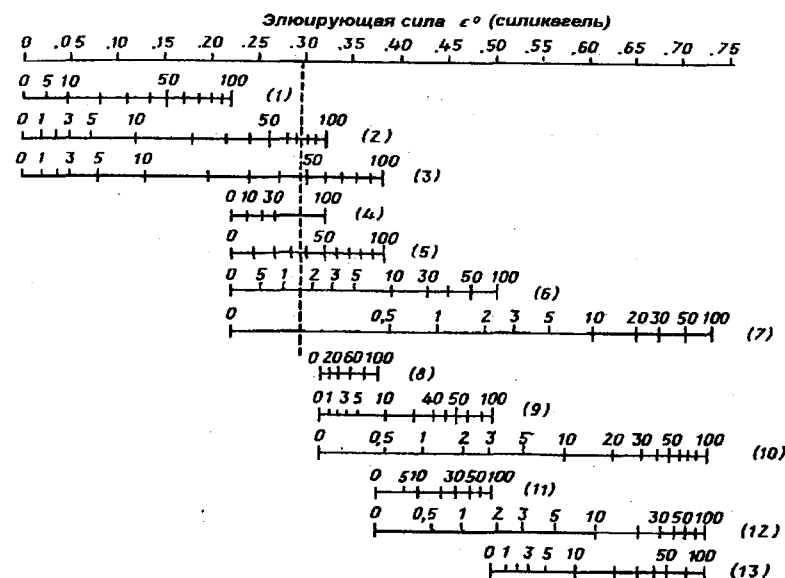


Рис. 6.21. Изоэлюотропные ряды для бинарных смесей растворителей с указанием элюирующей способности ϵ^o , сорбент – силикагель: (1) – изопропилхлорид в гексане; (2) – метиленхлорид в гексане; (3) – диэтиловый эфир в гексане; (4) – метиленхлорид в изопропилхлориде; (5) – диэтиловый эфир в изопропилхлориде; (6) – ацетонитрил в изопропилхлориде; (7) – метанол в изопропилхлориде; (8) – диэтиловый эфир в метиленхлориде; (9) – ацетонитрил в метиленхлориде; (11) – ацетонитрил в диэтиловом эфире; (12) – метанол в диэтиловом эфире; (13) – метанол в ацетонитриле

лаемую селективность. Однако этот метод проб и ошибок, в лучшем случае, утомителен, а иногда не дает возможности решить поставленную задачу. Отнюдь не все из многочисленных теоретически возможных изоэлюотропных смесей в равной степени пригодны для практического применения в рутинных методиках. В настоящее время имеются общие правила, позволяющие подходить системно к решению вопроса оптимизации селективности. Если использование чистых растворителей в соответствующей области значений T_R не приводит к успешному разделению соседних зон, то следует перейти к многокомпонентным смесям растворителей.

Для разделения простых проб наиболее пригодны двухкомпонентные смеси растворителей. При анализе сложных проб могут понадобиться трех- и четырехкомпонентные смеси растворителей. Для бинарных смесей растворителей примерно равной элюирующей способности максимальная селективность достигается: а) если один компонент является очень сильным и присутствует в очень небольших количествах (например, 0.01% ДМСО в гексане) или б) если оба компонента сравнительно слабые и более сильный компонент присутствует в большом количестве (например, смесь гексана и бензола, 20:80). Как правило, смеси со средней концентрацией

Таблица 6.21. Элюотропные серии ПФ для НФХ на силикагеле [252]

ε^0	Содержание растворителя А в смеси, % (об.)					
	ДХЭ/ОКТ	МТБЭ/ОКТ	АН/Ф-113	МТБЭ/ДХЭ	АН/ДХЭ	МЛ/ДХЭ
0.00	0	0	0	0	0	0
0.05	3.5					
0.10	10	0.2	0.3			
0.15	18	0.6	0.6			
0.20	32	1.4	1.1			
0.25	58	4.3	2			
0.30	100	13	3.5	0	0	0
0.35		35	8	30	12	
0.40		57	24	60	30	3.5
0.45		84	52	88	55	6
0.50			88		88	9
0.60			100		100	16
0.70						28
0.80						52
0.90						95

каждого компонента характеризуются малой селективностью (смесь гексана и диэтилового эфира, 60:40).

Системный подход к повышению селективности основан на использовании четырехкомпонентных смесей растворителей, например, октан – метиленхлорид – ацетонитрил – метил-*трет*-бутиловый эфир ($A - B - C - D$), каждому из которых свойствен свой механизм адсорбции. Растворитель B адсорбируется слабо, C является сильно полярным, D – основным. Варьируя содержание B , C и D , можно изменять селективность в широких пределах. Растворитель A используется для установления определенной элюирующей способности. Дополнительный ресурс повышения селективности может быть изыскан при замене растворителя C на другой основной растворитель – триэтиламин, пиридин, тетрагидрофуран или диметилсульфоксид. Следует избегать растворителей, являющихся донорами протонов. Соотношение C/D следует изменять, только после того, как определена оптимальная концентрация $C+D$. Во многих случаях систему растворителей можно упростить до трехкомпонентной смеси $A - C - D$. Не следует пренебрегать совместным влиянием природы растворителя и активности сорбента.

Таблица 6.22. Изоэлюотропные составы растворителей (об.%) [77]

ε^0	Состав 1	F-113	Состав 2	F-113	Состав 3	F-113
0.70					100	0
0.60					78	22
3.50					55	45
0.45					43	57
3.40			100	0	31	69
3.35			40	60	18	82
3.30	100	0	16	84	6	94
0.25	65	35	9	91	3	97
0.20	45	55	5.5	94.5	2	98
0.15	27	73	3.5	96.5	1.5	98.5
0.10	14	86	2.0	98.0	1.0	99.0
0.05	5	95	1.0	99.0	0.4	99.6
0.0	0	100	0.0	100	0.0	100

Таблицы и номограммы не дают возможности произвольно варьировать параметрами, необходимо оперировать их дискретными значениями. Есть смысл, используя компьютерный анализ набора данных ε'_{12} для серии типичных нормально-фазовых подвижных фаз, найти адекватную феноменологическую модель, позволяющую рассчитывать элюирующую силу бинарных элюентов произвольного состава.

Под понятием феноменологическая модель обозначим регрессию, описывающую эмпирическую зависимость элюирующей силы от состава смеси, включающую, как и уравнение (6.30), свойства исходных растворителей.

Наибольший интерес представляют системы, в которых в качестве разбавителя используют гексан. В табл. 6.23 приведены экспериментальные данные по эффективной элюирующей силе смесей гексан – модификатор на силикагеле.

Изотермы $\varepsilon' = f(\varphi_2)$ для ПФ гексан – модификатор точнее всего описывают рациональные функции 4 порядка [402]:

$$\varepsilon'_{12} = (k_1 + k_2 \varphi_2) / (1 + k_3 \varphi_2 + k_4 \varphi_2^2), \quad (6.34)$$

где k_i – эмпирические коэффициенты, φ_2 – объемная доля модификатора, ε'_{12} – элюирующая сила бинарной смеси.

Преобразуем функцию (6.34) таким образом, чтобы заменить 2 коэффициента с неявным физическим смыслом значениями ε' разбавителя и модификатора

$$\varepsilon'_{12} = \{\varepsilon'_1 + [\varepsilon'_2(1+A+B) - \varepsilon'_1]\varphi_2\} / (1 + A\varphi_2 + B\varphi_2^2), \quad (6.35)$$

где ε'_1 и ε'_2 – элюирующая сила разбавителя и модификатора, A и B – эмпирические коэффициенты. Уравнение (6.35) составлено так, чтобы соблюдались граничные условия: при $\varphi_2 = 0$, $\varepsilon'_{12} = \varepsilon'_1$; при $\varphi_2 = 1$, $\varepsilon'_{12} = \varepsilon'_2$.

Оптимизированные коэффициенты A и B уравнения (6.35) компенсируют друг друга. $B = -0,3205A$ ($R = 0,9997$). Компенсационный эффект обусловлен накладываемыми граничными условиями. Таким образом, получаем рациональное уравнение, в котором имеется только один эмпирический коэффициент, зависящий от типа модификатора [402]:

$$\varepsilon'_{12} = \{\varepsilon'_1 + [\varepsilon'_2(1 + 0,6795A) - \varepsilon'_1]\varphi_2\} / (1 + A\varphi_2 - 0,3205A\varphi_2^2). \quad (6.36)$$

Сопоставление параметров теоретического уравнения (6.30) для разных растворителей, а также полярности этих растворителей, выраженной в разных критериях (P' , δ_r , ε и др.) со значениями ко-

эффициента A (табл. 6.24.), позволяет выявить его физический смысл. При переходе от диэтилового эфира, диоксана, ТГФ и этилацетата к пропан-2-олу коэффициент A увеличивается на порядок, при этом величина поперечного сечения молекулы с $n_2 = 4,5-6$ возрастает до $n_2 = 8$ (табл. 6.19) и в 2–9 раз увеличиваются параметры, характеризующие полярность растворителя. Учитывая сложный механизм адсорбции в режиме НФХ и недостаточное для обобщения количество данных, можно тем не менее предположить, что к факторам, определяющим величину коэффициента A , относится площадь молекулы модификатора n_2 и совокупность полярных свойств, отражающих его способность к разным межмолекулярным взаимодействиям с разбавителем, сорбатом и адсорбентом.

В [402] были проверены соотношения между фактором удерживания и суммарной элюирующей способностью бинарных ПФ, приведенных в табл. 6.23, на экспериментальных характеристиках удерживания фенола и его производных и других липофильных соединений на силикагеле Силасорб 600. Анализ экспериментальных данных показал, что функции $k = f(\varepsilon'_{12})$ изменяются более монотонно, чем $k = f(\varphi_2)$, однако заменой независимой переменной φ_2 на ε'_{12} не удастся их линеаризовать в широком интервале концентраций модификатора.

$$\lg k = C - D\varepsilon'_{12} \quad (6.37)$$

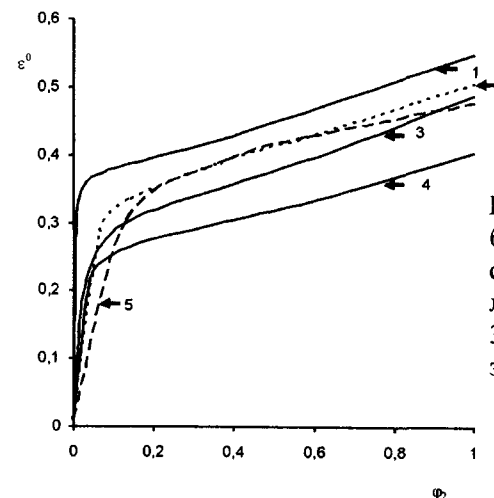


Рис. 6.22. Элюирующая сила бинарных подвижных фаз гексан – модификатор на силикагеле: 1 – пропан-2-ол; 2 – диоксан; 3 – этилацетат; 4 – диэтиловый эфир; 5 – ТГФ [402]

Таблица 6.23. Элюирующая сила ϵ_{12} для бинарных систем гексан – модификатор

Модификатор	φ_2	ϵ° эксп.	ϵ° расч. по (6.36)
Диэтиловый эфир	0	0.01	0.01
	0.040	0.22	0.22
	0.081	0.25	0.25
	0.166	0.28	0.27
	0.443	0.31	0.31
	0.649	0.35	0.34
	1	0.30-0.43*	0.40
Этилацетат	0	0.01	0.01
	0.015	0.18	0.16
	0.038	0.23	0.23
	0.077	0.27	0.28
	0.158	0.32	0.31
	0.428	0.36	0.36
	0.636	0.44	0.40
	1	0.48-0.50*	0.49
ТГФ	0	0.01	0.01
	0.134	0.33	0.30
	0.383	0.40	0.39
	0.591	0.48	0.43
	1	0.44-0.51*	0.48
Диоксан	0	0.01	0.01
	0.068	0.30	0.29
	0.140	0.34	0.33
	0.395	0.38	0.39
	0.603	0.48	0.43
	1	0.45-0.52*	0.50
Пропан-2-ол	0	0.01	0.01
	0.003	0.27	0.25
	0.006	0.29	0.30
	0.012	0.31	0.33
	0.030	0.33	0.36
	0.061	0.36	0.37
	0.128	0.41	0.39
	0.369	0.46	0.42
	1	0.55	0.55

*Примечание: максимальный разброс значений, встречающихся в литературе [63,130,252].

Наилучшая линеаризация наблюдается при использовании полулогарифмических анаморфоз $\lg k = f(\epsilon'_{12})$ в интервалах $\varphi_2 = 0.005-0.03$ для жирорастворимых витаминов и $\varphi_2 = 0.03-0.1$ для фенолов. Расчеты показали, что линейные зависимости (6.37) хорошо соблюдаются при хроматографировании большой серии производных циклопентанона (полупродуктов синтеза простогландинов) на силикагеле Зорбакс Сил в системах гексан – 2-пропанол в интервале $\varphi_2 = 0.05-0.20$; гексан – диоксан ($\varphi_2 = 0.15-0.40$); гексан – этилацетат ($\varphi_2 = 0.50-0.90$) [13].

Итак, величины ϵ'_{12} , принятые за стандартные, могут применяться вместо объемной доли модификатора в качестве независимой переменной в прогнозе фактора удерживания при сравнении хроматографических свойств сорбатов разного строения в элюентах, отличающихся не только составом, но и природой модификатора. Величина ϵ'_{12} более удобна, чем объемные доли отличающихся друг от друга модификаторов, так как позволяет наблюдать динамику изменения удерживания в единой системе координат. В то же время ясно, что она не пригодна для точного прогноза элюирующей силы, ввиду того, что ϵ° зависит не только от типа модификатора, от его концентрации, от эффектов локализации, от типа и состояния сорбента, но и от строения соединений, по которым он определялся. Поэтому фактическое хроматографическое поведение полифункциональных соединений может отличаться от ожидаемого на основании величин ϵ'_{12} , принятых в качестве независимых переменных.

Феноменологическая модель (6.36) может применяться для расчета изоэлюотропных ПФ. Однако при прогнозировании фактора

Таблица 6.24. Элюирующая сила ϵ'_2 модификаторов и эмпирические коэффициенты уравнения (6.36) для ПФ гексан – модификатор, $\epsilon'_1 = 0.01$

Модификатор	ϵ'_2	A	R
Диэтиловый эфир	0.41	87.44	0.9996
Этилацетат	0.50	64.93	0.9968
Тетрагидрофуран	0.51	16.68	0.9969
Диоксан	0.52	44.68	0.9937
Пропан-2-ол	0.55	636.3	0.9876

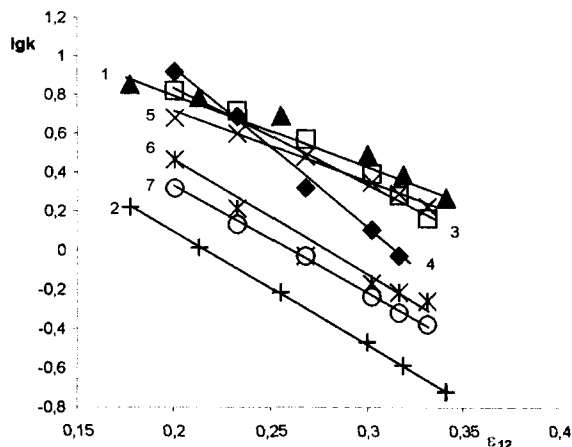


Рис. 6.23. Зависимости $\lg k = f(\epsilon'_{12})$ фенольных соединений на сорбенте Силасорб 600 в элюентах: гексан – диоксан (1 – фенол; 2 – 3-(4-бифенил)-1-(2-гидроксифенил)-1-пропанон); гексан – этилацетат (3 – фенол; 4 – эвгенол; 5 – 2-нафтол; 6 – 2-метил-6-(3-фенилпропил)фенол; 7 – 3-(4-метилбутилфенил)-1-(2-гидроксифенил)-1-пропанон [402]

удерживания в условиях НФХ, недостаточно экспериментально определить его при двух произвольных составах. Желательно, чтобы $\Delta\varphi_2$ не превышала нескольких объемных процентов и находилась внутри одного из интервалов, ограниченных точкой перегиба изотермы $\epsilon' = f(\varphi_2)$ (рис.6.22.). Широкая экстраполяция может привести к существенной ошибке в определении величины фактора удерживания, предсказываемого расчетом. Для элюентов, содержащих пропан-2-ол, перегиб находится около $\varphi_2 = 0.03$, для других модификаторов, приведенных в табл. 6.23, он наблюдается в области $\varphi_2 = 0.08-0.14$. Наименее точный прогноз параметров удерживания имеют низкомолекулярные сорбаты с полярной функциональной группой в разбавителе ($\varphi_2 = 0$).

На практике, получив по уравнению (6.36) или по табличным данным соотношение растворителей в изоэлюотропной смеси и обнаружив, что в эксперименте она оказалась слишком низкой или слишком высокой, ее можно скорректировать, изменив содержание гексана.

Кроме параметра ϵ'_{12} , в условиях распределительной НФХ на силикагеле и модифицированных силикагелях элюирующую силу

оценивают по параметру полярности P' [130]. Величина P' изменяется от -2.0 (фторзамещенные углеводороды) до 10.2 (вода). Изменение P' на 2 единицы приводит к десятикратному изменению фактора удерживания k . Величина P' для смеси растворителей определяется как среднее арифметическое

$$P'_{\text{сум}} = \sum \varphi_i P'_i \quad (6.38)$$

Величина P' для индивидуальных растворителей достаточно хорошо коррелирует с ϵ' ($\epsilon' \approx 0.1 P'$). Конечно, общепризнано, что $P'_{\text{сум}}$ является приближенной мерой оценки элюирующей способности растворителя в адсорбционной и в распределительной НФХ.

Более точными критериями, чем P' , являются обобщенные критерии P^o и P_{N^o} , рассмотренные в предыдущей главе, они лучше коррелируют с ϵ' и дают удовлетворительный прогноз элюирующей силы сорбатов разного строения при концентрациях модификатора выше 5% об.

В табл. 6.25 в качестве примера приведены изоэлюотропные ряды, рассчитанные по аддитивному уравнению. Анализ данных работ [242,243,375,376,402], посвященных НФХ соединений фенольного типа, показывает, что изоэлюотропные ряды, построенные на основе обобщенных критериев полярности, дают систематические расхождения, если сопоставляются ПФ с модификаторами из разных групп селективности. Так, элюенты с пропан-2-олом и этанолом (II группа селективности) или с этилацетатом и диоксаном (VI группа) попарно образуют безупречные изоэлюотропные ряды, в то же вре-

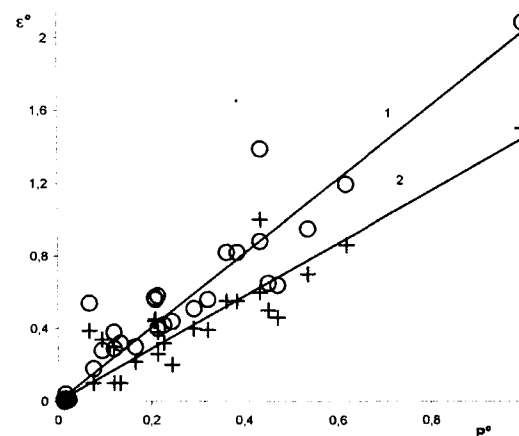


Рис. 6.24. Корреляции между элюирующей силой ϵ' на силикагеле (2) и на оксиде алюминия (1) с рациональным параметром полярности P^o

мя систематично отличающиеся между собой. Неизбежные экспериментальные расхождения параметров удерживания в элюентах с одинаковой по выбранному критерию элюирующей силой, но содержащих модификаторы из разных групп селективности даже полезны, так как позволяют более тонко регулировать селективность хроматографической системы. Эти отличия не так велики, не более допустимых для изоэлюотропных рядов по Схунмакерсу [55]. При использовании концепции изоэлюотропных составов практически важным представляется то, что при изменении качественного состава изоэлюотропных смесей, можно примерно сохранить уровень удерживания и в то же время улучшить селективность разделения. В рамках этого подхода полезным приемом является составление трехкомпонентных элюентов типа гексан – диоксан – пропан-2-ол или гексан – этилацетат – пропан-2-ол, изоэлюотропных бинарным элюентам гексан – пропан-2-ол и гексан – этилацетат (диоксан). Хроматографические системы с трехкомпонентными ПФ показали себя эффективнее, чем с бинарными фазами, содержащими модификаторы VI группы. В то же время их селективность лучше селективности систем с бинарными спиртосодержащими подвижными фазами. Небольшая добавка к разбавителю спирта уменьшает размывание пика фенолов, доводка элюента до необходимой элюирующей силы третьим компонентом – этилацетатом более мягко, чем одним спиртом, сближает объемы удерживания фенолов, существенно различающихся по способности удерживаться на сорбенте.

6.9.2. Влияние состава в обращенно-фазовой хроматографии

В ОФХ с увеличением полярности органического модификатора его элюирующая сила падает. Фактор удерживания в условиях ОФХ в общем случае не линейно зависит от состава подвижной фазы, эту зависимость можно выразить квадратным уравнением (6.39)

$$\ln k = A\varphi^2 + B\varphi + C, \quad (6.39)$$

где φ – объемная доля органического модификатора, A , B и C – эмпирические коэффициенты, A имеет положительный знак, B – большую величину и отрицательный знак, C – натуральный логарифм фактора удерживания в чистой воде. Справедливость уравнения (6.38) подтверждена на многочисленных экспериментальных данных [55]. Значительные отклонения от этой зависимости могут наблюдаться при низком содержании модификатора ($\varphi < 0.1$). Коэффициент C не обязательно соответствует фактору удерживания в чистой воде. В [55] рассмотрены и другие способы математического описания зависимостей фактора удерживания от φ в условиях ОФХ. Использование нелинейных зависимостей облегчает описание влияния состава на удерживание в широком диапазоне варьирования φ . Такие большие рабочие интервалы представляют ограниченный интерес. Очень малые и очень большие значения фактора емкости не привлекают хроматографистов. Наиболее приемлемые значения $k=1-10$. В пределах этого диапазона фактор удерживания адекватно описывается линейным уравнением

$$\lg k = \lg k_1 - S\varphi_2, \quad (6.40)$$

где k_1 – экстраполированный фактор удерживания в чистой воде, а φ_2 – объемная доля органического модификатора в подвижной фазе, S – эмпирический показатель, принятый за характеристику элюирующей способности растворителя. Следует отметить, что показатель S , вопреки изначальному предположению Снайтера, не является постоянной величиной для данной неподвижной фазы и двух компонентов данной ПФ и зависит от удерживания сорбата, кроме того, уравнение (6.40) приблизительно соблюдается лишь при изменении состава элюента в пределах 30% [55]. Коэффициент k_1 , как и C , в уравнении (6.39) не дает точной оценки удерживания в воде. Для тройных систем уравнение (6.40) пригодно только в том случае, если используются псевдо-

Таблица 6.25. Серия ПФ для НФХ изоэлюотропных по величине $R^0_{\text{сум}}$

$R^0_{\text{сум}}$	0.022	0.027	0.0295	0.0396	0.047	0.117
Подвижные фазы	φ_2					
Изооктан – пропан-2-ол	0.029	0.042	0.05	0.078	0.1	0.3
Гексан – пропан-2-ол	0.015	0.03	0.035	0.065	0.086	0.29
Гексан – диоксан	0.027	0.052	0.071	0.12	0.155	0.52
Гексан – диоксан – пропан-2-ол *	0.026	0.051	0.07	0.119	0.154	0.519
Гексан – этилацетат	0.025	0.050	0.07	0.115	0.150	0.50
Гексан – этилацетат – пропан-2-ол *	0.024	0.049	0.069	0.114	0.149	0.499
гексан - хлороформ	0.025	0.050	0.070	0.115	0.150	0.50
Гексан – этанол	0.012	0.024	0.03	0.055	0.072	0.24
Гептан – диоксан	0	0.025	0.04	0.095	0.135	0.51

Примечание: *Доля пропан-2-ола $\varphi_2=0.001$

бинарные системы, т.е. тройные смеси, в которых соотношение объемных долей двух модификаторов постоянны.

Для расчета изоэлюотропных составов в ОФХ применяли и диэлектрическую проницаемость [377], и полярность P' [51], и растворимость Гильдебранда δ_T [55] и сольватохромный параметр E_T^N [403-406], и, наконец, обобщенные критерии полярности, являющиеся комбинацией предыдущих 4-х показателей [367].

Допустим, что суммарная полярность в смесях вода – модификатор аддитивна.

$$P_i = \sum \varphi_i P_i \quad (6.41)$$

где P_i – полярность, а φ_i – объемная доля i -го растворителя. Это допущение принято в распределительной ЖХ для параметров P' и в ОФХ для δ_T [55]. Зависимость ϵ_r от состава в водных смесях ацетонитрила и метанола также близка к линейной [377]. Если отбросить относительно быстрое изменение E_T^N для смесей воды с большинством модификаторов в области $\varphi_2=0.95-1.0$, а для ацетонитрила еще и в области $\varphi_2=0-0.05$, которые обусловлены спецификой сольватохромного эффекта, параметр E_T^N также адекватно описывается линейной зависимостью от объемной доли воды. Распространим допущение об аддитивности, принятое для частных критериев полярности, на обобщенные критерии P' и P_N . В первом приближении можно считать, что в смесях одинаковой полярности одинаковыми будут и параметры удерживания. Другими словами, можно ожидать, что смеси с одинаковыми P_i (ϵ_r , δ_T , P' , E_T^N , P' или P_N) имеют одинаковую элюирующую способность, т.е. являются изоэлюотропными. Для двух бинарных смесей с разными модификаторами можно записать равенство

$$(1-\varphi_X)P_B + \varphi_X P_X = (1-\varphi_Y)P_B + \varphi_Y P_Y, \quad (6.42)$$

где φ_X и φ_Y – объемные доли модификаторов X и Y в изоэлюотропной смеси, P_B – полярность воды, P_X и P_Y – полярности соответствующих модификаторов. Из уравнения (6.42) следует, что

$$\varphi_X = \varphi_Y (P_Y - P_B) / (P_X - P_B) \quad (6.43)$$

Возьмем в качестве стандартного модификатора метанол и обозначим отношение разностей полярности $(P_M - P_B) / (P_X - P_B)$ как Δ_r , где $P_M - P_B$ для метанола. Таким образом, мы получим коэффициент Δ_r , позволяющий легко рассчитать изоэлюотропный состав для выб-

ранного критерия полярности. В работе [55] Схунмакерс рассчитал коэффициент Δ_r для параметра растворимости. Рассчитаем его для остальных рассматриваемых критериев полярности (табл. 6.26). Коэффициент Δ_r для каждого модификатора соответствует его процентному содержанию в бинарных смесях с водой, эквивалентному одному объемному проценту метанола. Схунмакерсом детально показано, что параметр растворимости очень хорошо подходит для предсказания состава изоэлюотропных смесей в ОФХ. Соотношение (6.43) проверено на экспериментальных данных, полученных для большого числа образцов. Усредненные экспериментальные значения φ_X и φ_M в изоэлюотропных системах находили следующим образом. Предположим, что для некоего образца в смеси метанол – вода (1:1) получен фактор удерживания, равный 3. То же самое значение коэффициента k для этого образца найдено и в смеси ТГФ – вода (34:66). Для другого образца в водно-метанольной смеси (1:1) коэффициент k равен 30, и такое же его значение получено при использовании смеси ТГФ – вода (28:72). Усредненный состав смеси ТГФ – вода изоэлюотропный водно-метанольной смеси в данном примере равен 31:69. Из-за специфических взаимодействий соответствующие друг другу смеси на основе метанола и ТГФ, используемые для разных образцов, несколько различаются. И наоборот, если в качестве изоэлюотропного взять раствор ТГФ, состав которого является усредненным для большого числа образцов (или вы-

Таблица 6.26. Коэффициенты Δ_r для расчета состава изоэлюотропных смесей для ОФХ

Модификатор. (в воде)	δ_T	ϵ_r	P'	E_T^N	P'	P_N
Метанол	1	1	1	1	1	1
Этанол	0.81	0.85	0.86	0.69	0.82	0.81
Пропан-1-ол	0.73	0.79	0.82	0.62	0.75	0.75
Пропан-2-ол	0.74	0.78	0.81	0.52	0.73	0.72
Ацетонитрил	0.78	1.08	1.16	0.44	0.84	0.83
Ацетон	0.64	0.80	1.00	0.37	0.68	0.67
ТГФ	0.62	0.65	0.82	0.30	0.58	0.58
Диоксан	0.65	0.60	0.94	0.28	0.59	0.58
ДМСО	0.80	1.54	1.34	0.43	-	0.89

числен на основе теории параметра растворимости), некоторые соединения будут элюироваться позднее, чем при использовании исходной смеси метанол – вода, а некоторые раньше. Найдено, что для различных сорбатов эти относительные различия могут достигать 100%. Однако это не следует расценивать как ошибку в определении состава изоэлюотропных смесей. Скорее, это позволит использовать такие смеси для увеличения селективности, сохраняя удерживание примерно на том же уровне. Именно этот принцип широко применяется для оптимизации селективности в ЖХ.

Как видно из табл. 6.26, значения Δ_j , полученные по параметру растворимости, наиболее близки к Δ_r , полученным на основе обобщенных критериев полярности (P^o и P_N), а значит, положительные выводы, сделанные Схунмакерсом по применимости δ_r в оценке изоэлюотропных составов, полностью можно отнести к обобщенным критериям полярности.

Алгоритм расчета изоэлюотропных составов следующий. Для смеси метанола с водой, взятых в соотношении 50:50, следует ожидать приблизительно такого же фактора удерживания, как и для смеси, содержащей 0.58·50=29% ТГФ в воде, если расчет велся по параметру P_N (или 31% по параметру растворимости). Аналогично для ацетонитрила получаем 0.83·50=41.5% (по δ_r объемная доля модификатора в смеси составит 39%).

Все приведенные выше рассуждения легко можно распространить на изоэлюотропные смеси, содержащие более одного модификатора. Запишем уравнение (6.43) в следующем виде:

$$\varphi_j = \Delta_j \varphi_{\text{м.ст}} \quad (6.44)$$

Уравнение (6.44) связывает объемную долю модификатора в стандартной бинарной подвижной фазе метанол – вода с объемной долей j-го модификатора. Согласно аддитивной модели полярности, любая смесь двух изоэлюотропных смесей (с одинаковым значением выбранного параметра полярности) изоэлюотропна (т. е. характеризуется такой же элюирующей способностью) по отношению к исходным смесям. Следовательно, для любой тройной смеси двух бинарных изоэлюотропных смесей справедливо следующее уравнение:

$$\varphi_{\text{м.ст}} = \varphi / \Delta_r \quad (6.45)$$

которое можно распространить на многокомпонентные составы, полученные смешиванием ряда изоэлюотропных двойных смесей:

Таблица 6.27. Критерий Шатца (H), коэффициенты ур. (6.47) и коэффициент корреляции R для фенолов в ПФ вода – модификатор: ацетонитрил (1), метанол (2), * – общие корреляции, с учетом значений для обоих модификаторов (сорбент – Силасорб C_{18})

Соединение	H	φ_2	Модификатор	Коэффициенты		R
				a	b	
Пирокатехин	0.3	0.5-1	1	1.95	0.006	0.991
			2	1.73	0.009	0.966
			*	1.91	0.007	0.905
Фенол	2.0	0.5-1	1	1.93	0.007	0.993
			2	1.71	0.010	0.982
			*	1.87	0.008	0.959
o-Крезол	3.0	0.5-1	1	1.66	0.013	0.974
			2	1.50	0.014	0.966
			*	1.64	0.012	0.902
n-Крезол	3.0	0.5-1	1	1.72	0.012	0.996
			2	1.23	0.018	0.968
			*	1.60	0.013	0.921
Эвгенол	4.3	0.5-1	1	1.56	0.015	0.994
			2	0.63	0.030	0.981
			*	1.21	0.021	0.939
2-Нафтол	6.0	0.5-1	1	1.50	0.018	0.967
			2	0.66	0.029	0.980
			*	1.32	0.020	0.890
n-трет-Бутилфенол	6.0	0.6-1	1	1.15	0.026	0.982
			2	0.20	0.038	0.939
			*	1.13	0.025	0.826
Ионол	11.3	0.75-1	1	0.65	0.039	0.992
			2	1.08	0.066	0.997
			*	0.41	0.042	0.929
3-(2,4-диметилфенил)-1-(2-гидроксифенил)-пропан-1-он	12.0	0.75-1	1	0.48	0.044	0.998
			2	0.70	0.058	0.998
			*	0.90	0.033	0.791
3-(4-трет-бутил-фенил)-1-(2-гидроксифенил)-пропан-1-он	13.3	0.75-1	1	0.36	0.046	0.998
			2	0.90	0.063	0.996
			*	0.51	0.041	0.906
3-(бифенил-4-ил)-1-(2-гидроксифенил)-пропан-1-он	15.3	0.75-1	1	0.19	0.049	0.975
			2	0.65	0.058	0.988
			*	0.68	0.038	0.841

$$\varphi_{\text{м.ст}} = \Sigma \varphi / \Delta_j \quad (6.46)$$

Из уравнения (6.46) следует, что если по осям отложить две переменные – $\varphi_{\text{м}}$ и $\varphi_{\text{р}}$, то тройные изоэлюотропные смеси описываются прямой. Четырехкомпонентные изоэлюотропные смеси образуют плоскость в трехмерном пространстве и т. д. Уравнения (6.45) и (6.46) удобны для определения состава изоэлюотропных смесей и вычисления элюотропной силы многокомпонентных ПФ, исходя из соответствующих смесей метанол – вода.

Анализ экспериментальных данных [376] показал, что для фенолов разного строения в сериях элюентов ацетонитрил – вода и метанол – вода в диапазоне $\varphi_2 = 1-0.5$ наблюдаются удовлетворительные общие корреляции.

$$\lg V_R = a + bP_N \quad (6.47)$$

где V_R – объем удерживания в мкл, а P_N – суммарный редуктивный критерий полярности элюента, полученный расчетом по (6.41). Если бы принцип изоэлюотропности не соблюдался, частные корреляции, найденные в отдельных метанольных или ацетонитрильных сериях, существенно отличались бы по коэффициентам a и b . Однако на удерживание фенолов влияет прежде всего суммарная полярность элюента и в меньшей степени тип модификатора, что согласуется с универсальным характером редуктивного критерия.

С другой стороны, значения V_R увеличиваются в соответствии с сольвофобным механизмом удерживания на обращенных НФ прямо пропорционально с увеличением гидрофобности сорбата. Последняя определена в виде упрощенного критерия Шатца H [13]. Между параметрами удерживания фенолов и их гидрофобностью в изоэлюотропных и близких по полярности подвижных фазах прослеживаются тесные корреляции (табл. 6.27)

$$\lg V_R = c + dH \quad (6.48)$$

Наличие явных корреляций между удерживанием фенолов и полярностью ПФ, выраженной в виде обобщенного критерия полярности, а также между структурой (гидрофобностью) сорбатов и их удерживанием в изоэлюотропных по данному критерию смесях, подтверждает возможность его применения в изучении хроматографического поведения веществ в зависимости от полярности подвижной фазы и структурных особенностей сорбата. Вместе с тем

Таблица 6.28. Коэффициенты уравнения (6.48) и коэффициент корреляции R для фенолов* в подвижных фазах вода – ацетонитрил (1) и вода – метанол (2) (сорбент Силасорб C_{18})

Модификатор	φ_2	P_N	Коэффициенты ур. (6.48)		R
			c	d	
1	1	44.66	2.22	0.015	0.957
2	1	53.34	2.22	0.015	0.924
1	0.8	55.73	2.22	0.049	0.968
2	0.8	62.67	2.18	0.059	0.933
1	0.75	58.50	2.26	0.061	0.988
2	0.75	65.01	2.21	0.069	0.971
1	0.6	66.80	2.29	0.076	0.923
2	0.6	72.00	2.29	0.098	0.900
1	0.5	72.33	2.35	0.071	0.926
2	0.5	76.67	2.39	0.092	0.908

*см. табл. 6.27

очевидны определенные различия в селективности подвижных фаз с ацетонитрилом и метанолом, которые выражаются в том, что частные корреляции (6.46) выполняются лучше, чем общие.

Практическое значение корреляций, подобных (6.46) и (6.47) заключается в том, что по ним можно оценить характеристики удерживания аналитов в выбранных условиях ОФХ при произвольном составе ПФ, рассчитать V_R при переходе с одного элюента на другой, спрогнозировать возможность разделения соединений с различной гидрофобностью в подвижной фазе с заданной полярностью.

6.9.3. Влияние температуры

Температура является одним из наиболее важных термодинамических параметров хроматографического разделения. Удерживание подчиняется уравнению Вант-Гоффа:

$$\ln k = (\Delta H/RT) - \Delta S/R + \ln \beta, \quad (6.49)$$

где ΔH и ΔS – парциальные мольные вклады энтальпии и энтропии в распределение образца между двумя фазами, R – универсальная газовая постоянная, T – абсолютная температура, а β – фазовое отношение. Схематично влияние температуры можно описать зависимостью

$$\ln k = A/T + B, \quad (6.50)$$

где коэффициент A обычно больше нуля, поэтому удерживание уменьшается с ростом температуры [55]. В то же время известны наблюдения, когда скорость движения концентрационных зон с повышением температуры может уменьшаться или оставаться постоянной [52]. Изменение температуры не очень сильно влияет на удерживание и селективность в области 20–35 °С, а при температурах выше 35 °С движение концентрационных зон может значительно ускоряться. В работе [52] рассмотрены ситуации, когда диапазон температур был расширен от -50 до 200 °С. Показано, что конкурирующее взаимодействие растворителя с адсорбентом уменьшает адсорбцию растворенного вещества. Взаимодействие растворенного вещества с растворителем также уменьшает его адсорбцию, поэтому энергия адсорбции растворенного вещества зависит от суммарного действия этих трех эффектов и относительного влияния каждого из них. В зависимости от того, как изменяется каждый из этих трех видов межмолекулярных взаимодействий с температурой, влияние температуры на удерживаемые объемы растворенных веществ будет различным. Удерживаемые объемы сильно адсорбирующихся растворенных веществ в большей степени зависят от температуры, и повышение температуры в этом случае эквивалентно переходу к растворителю с большей элюирующей способностью. Поэтому при работе с чистыми растворителями (без добавления полярных компонентов) может быть полезным программирование температуры колонки. В изучении влияния температуры на удерживание в условиях НФХ с применением бинарных растворителей величины параметров удерживания могут либо уменьшаться, либо возрастать или оставаться практически неизменными. Полярный модификатор при повышении температуры легче десорбируется с активных центров адсорбента, последний получает возможность сильнее адсорбировать растворенные вещества, их объемы удерживания увеличиваются.

Метод программирования температуры колонки в системе со смешанным растворителем может дать эффект, аналогичный эффекту градиентного элюирования. При обычном градиентном элюировании происходит постепенное увеличение концентрации полярного компонента во время анализа, но у входа в колонку концентрация полярного компонента всегда больше, чем у выхода. В результате этого полоса анализируемого растворенного вещества в начале колонки движется быстрее, чем в ее конце. При использовании метода программирования температуры для осуществления этого эффекта нет необходимости создавать градиент полярности элюента по длине колонны, так как при повышении температуры происходит постепенная десорбция полярного компонента в подвижную фазу сразу по всей длине колонны. Этот метод обеспечивает лучшее разделение по сравнению с обычным градиентным элюированием, но имеет недостаток – длительную подготовку системы к следующему анализу. Следует учитывать, что в режиме программирования температуры происходит изменение вязкости растворителя, в результате чего уменьшается эффективность разделения. Вязкость элюента при повышении температуры на 50 °С снижается примерно на 50%. Вязкость при работе с постоянным входным давлением меняется соответственно изменению температуры и одновременно влияет на скорость элюента. Увеличение же скорости ускоряет элюирование более сильно удерживающихся веществ.

Понятно, что значительно в большей степени на удерживание влияет состав подвижной фазы. Однако все, что справедливо для газовой хроматографии, распространяется и на жидкостную хроматографию. Поскольку температура и состав не могут быть независимыми переменными, то различным температурам соответствует свой оптимальный состав ПФ.

Что касается совместного влияния температуры и состава бинарной подвижной фазы в условиях ОФХ на удерживание и селективность, то установлено, что с увеличением температуры удерживание предсказуемо уменьшается, но селективность при этом меняется незначительно [55]. Поскольку обычно имеется лишь небольшой интервал, в пределах которого удерживание всех компонентов данного образца не слишком сильное и не слишком слабое, для повыше-

ния селективности нельзя применять резкое изменение температуры. Однако уменьшение удерживания, обусловленное повышением температуры, можно компенсировать увеличением содержания воды в подвижной фазе. Для водно-метанольных смесей это приводит к увеличению селективности. Следовательно, можно сделать вывод, что при одновременном увеличении температуры и содержания воды в подвижной фазе селективность обычно возрастает, в то время как удерживание остается постоянным. Недостатком работы на обращенно-фазовых колонках при повышенных температурах является их ускоренная амортизация, обусловленная тем, что в этих условиях силикагель быстрее растворяется в подвижной фазе. Этот эффект может также привести к снижению воспроизводимости системы (ширины пиков и значений факторов удерживания).

Простое и удобное уравнение для описания совместного влияния температуры и состава подвижной фазы на удерживание предложено Меландером и др. [55]:

$$\ln k = A_1 \varphi (1 - T_c/T) + A_2/T + A_3, \quad (6.51)$$

где A_i – это константы для данного соединения на конкретной неподвижной фазе при двух заданных компонентах подвижной фазы, а T_c – так называемая, компенсационная температура, при которой удерживание не зависит от состава подвижной фазы. Термин “компенсационная температура” указывает на то, что при температуре T_c вклады энтропии и энтальпии компенсируют друг друга. В обращенно-фазовых системах эта температура практически не зависит от образца. Судя по величине T_c (200–300°C), это гипотетическая, а не практически достижимая температура. Для всех практических целей T_c можно рассматривать как произвольный коэффициент, величину которого можно определить исходя из экспериментальных данных по удерживанию.

Чтобы определить параметры уравнения (6.51), потребуется несколько, по крайней мере четыре экспериментально полученных точки. Уравнение (6.51) можно применять лишь в ограниченном диапазоне составов, например, в которых фактор удерживания $1 < k < 10$. Описывая удерживание как функцию температуры и состава, необходимо использовать более сложное уравнение, если состав варьирует в широких пределах. Объединив квадратное урав-

нение (6.69), связывающее удерживание и состав, с уравнением (6.51), получим

$$\ln k = A'(1 - a/T) \varphi^2 + B'(1 - b/T) \varphi + C'(1 - c/T), \quad (6.52)$$

где A' , B' , C' , a , b и c – константы.

При постоянной температуре это уравнение сводится к уравнению (6.39), а при постоянном составе – к уравнению (6.50).

Поскольку насадка имеет плохую теплопроводность, то недостаточно термостатировать только колонку и программировать температуру только в ней. Необходимо, чтобы элюент уже перед колонкой имел заданную температуру. Для детектирования при анализе с программированием температуры целесообразно использовать спектрофотометрический детектор, малочувствительный к изменению температуры.

6.9.4. Влияние давления

Первоначально ВЭЖХ называли жидкостной хроматографией при высоких давлениях [54]. Высокая линейная скорость перемещения жидкой фазы достигается за счет применения в ВЭЖХ высокого давления (1–50 МПа). Перепад давления понуждает жидкость перетекать по колонке. Чем больше расход ПФ, тем большая скорость элюирования приводит к возрастанию рабочего давления. Создание надежных насосов, применение новых сорбентов с диаметром зерен до 3 мкм, привело к тому, что для реализации высокоскоростной ВЭЖХ требуются рабочие давления до 30–70 МПа. Для колонок зернением 1.5 мкм требуются насосы с давлением до 320 МПа. Таким образом, давление является вторым важным термодинамическим фактором хроматографического процесса.

Считается, что изменение скорости потока одинаково (не селективно) влияет на параметры удерживания всех присутствующих в хроматографируемом анализе компонентов, так как давление практически не изменяет хроматографических свойств ПФ. Т.е. за счет изменения скорости потока можно добиться только суммарного сокращения времени анализа. Вместе с тем, это утверждение верно только в первом приближении. Например, утверждается, что в условиях ВЭЖХ жидкости практически не сжимаются, а значит, прак-

тически не изменяются их свойства, зависящие от плотности жидкостей (показатель преломления, диэлектрическая проницаемость, вязкость). В табл. 6.29 приведены данные о сжимаемости некоторых растворителей, рассчитанные для давлений 20 и 40 МПа по коэффициентам сжимаемости β , приведенным в работе [386]. Этот коэффициент при постоянной температуре определяется соотношением

$$\beta = (1/V_0)(dV/dP)_T \quad (6.53)$$

В общем случае при увеличении давления P коэффициент β уменьшается, причем постепенно это уменьшение ослабевает. Зависимость коэффициента β от температуры велика при низких давлениях и очень мала при высоких ($P > 100$ МПа).

Таким образом, расчеты показали, что при не самых максимальных для ВЭЖХ рабочих давлениях жидкости могут сжиматься на 1.5-4.5%, вязкость при этом возрастет сильнее – на 5-10%. По данным [407], при 40 МПа диэлектрическая проницаемость увеличится по сравнению с атмосферным давлением на 10-30%, в 1.5 раза возрастет степень диссоциации воды, т.е. ионное равновесие сместится в сторону образования ионов. Аналогично изменятся константы диссоциации кислот и оснований в 1.2-4 раза. Отсюда следует, что диссоциация сопровождается уменьшением объема за счет эффектов гидратации и сольватации. В гидратной (сольватной) оболочке, окружающей ион, молекулы растворителя расположены более плот-

Таблица 6.29. Изменение объема хроматографических растворителей при увеличении давления, $V_0 = 0.1$ МПа, 20 °С

Растворитель	ΔV , %	Рабочее давление, МПа
Вода	1.0	20
	1.6	40
Метанол	1.9	20
	3.2	40
Хлороформ	1.7	20
	2.8	40
Этилацетат	1.8	20
Бромэтан	2.0	20
Бензол	1.5	20
Диэтиловый эфир	4.2	50

но, чем в объеме растворителя. Такие изменения свойств растворителя приводят к уменьшению или увеличению растворимости соединений при увеличении давления в зависимости от их строения. А значит, изменится коэффициент распределения в данной системе K , т.е. отношение концентраций сорбата в неподвижной фазе к концентрации сорбата в подвижной фазе будет в колонке с низким давлением отличаться от K для ЖХ низкого давления.

Из фундаментальных термодинамических соотношений для зависимости фактора удерживания k от давления P при постоянной температуре T можно записать следующее выражение

$$(d \ln k / dP)_T = -\Delta V / RT, \quad (6.54)$$

где ΔV – объемный эффект фактора удерживания. Если $\Delta V > 0$, фактор удерживания с повышением давления уменьшается, при $\Delta V < 0$ он возрастает, если $\Delta V = 0$, давление не влияет на сорбционный процесс. Судя только по тому, что растет диэлектрическая постоянная, следует ожидать увеличения полярности растворителя и пропорционально ей элюирующей силы подвижной фазы в условиях НФХ и, наоборот, ее уменьшения в условиях ОФХ. В связи с тем, что ионные равновесия весьма чувствительны к давлению, будет наблюдаться изменение рН при увеличении давления и, следовательно, видоизменятся параметры удерживания ионизирующихся соединений, которые зависят от рН и ионной силы элюента, как это показано в следующем разделе. Конечно, давление действует более мягко, чем температура. Его влиянием при рабочих давлениях ниже 10 МПа зачастую можно пренебречь, однако при $P > 20$ МПа целесообразно учитывать эффекты давления. В целом можно отметить, что этот вопрос еще мало изучен, но он будет привлекать к себе все большее внимание по мере развития техники ВЭЖХ.

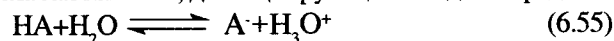
6.9.5. Влияние рН

Величина рН подвижной фазы влияет на удерживание в жидкостной хроматографии в том случае, если структура молекул анализа зависит от рН. Следовательно, влияние рН наблюдается в том случае, если молекулы образца могут существовать как в протонированной, так и в непротонированной форме. Величина рН может также влиять

на фактор удерживания ионов и нейтральных молекул, но этот эффект обычно мал, и мы его рассматривать не будем. В условиях ОФХ удерживание может сильно зависеть от pH в следующих случаях:

- 1) если в ПФ могут существовать различные формы аналита (например, протонированные и непротонированные), имеющие разное время удерживания;
- 2) если относительное содержание таких различных форм образца меняется с изменением pH.

Если анализируемое соединение может находиться в двух формах, то обычно выполняется первое условие, особенно если анализируются простые моnofункциональные соединения. Наиболее распространенный пример – это слабая кислота, диссоциирующая в водной среде:



Поскольку HA – нейтральная (незаряженная) молекула, а A⁻ – отрицательно заряженный ион, можно ожидать, что параметры удерживания этих двух форм одного соединения будут значительно различаться.

Второе условие зависит от диапазона изменений pH относительно константы равновесия образца. Константа диссоциации HA определяется как

$$K_a = [\text{A}^-][\text{H}_3\text{O}^+]/[\text{HA}], \quad (6.56)$$

так что для соотношения концентраций двух различных форм A (R_a) получаем

$$R_a = [\text{A}^-]/[\text{HA}] = K_a/[\text{H}_3\text{O}^+] \quad (6.57)$$

или

$$\lg R_a = \lg K_a + \text{pH} = \text{pH} - \text{p}K_a \quad (6.58)$$

Уравнение (6.58) показывает, что наибольших изменений можно ожидать вблизи $\text{pH} = \text{p}K_a$ при $R_a = 1$. Если pH превышает $\text{p}K_a$ на две единицы, $R_a = 100$, так что более 99% молекул аналита диссоциировано. Напротив, если pH на 2 единицы меньше $\text{p}K_a$, то в диссоциированной форме присутствует менее 1% молекул ($R_a = 0.01$). Следовательно, второе условие выполняется в том случае, если pH изменяется в области $\text{p}K_a$ анализируемого образца. Поскольку для обращенно-фазовых колонок на основе силикагеля рабочий диапазон ограничивается значениями pH от 2 до 7, можно ожидать, что образцы с $\text{p}K_a$ от 1 до 8 будут иметь разные времена удерживания при изменении pH во всем допустимом диапазоне. Иными слова-

ми, для слабых кислот, $\text{p}K_a$ которых находится в вышеупомянутом диапазоне, pH является важным параметром.

Подобные же доводы приводят и для основных образцов. В качестве примера рассмотрим реакцию



Константа диссоциации определяется выражением

$$K_b = [\text{HX}^+][\text{OH}^-]/[\text{X}], \quad (6.60)$$

так что

$$R_x = [\text{HX}^+]/[\text{X}] = K_b/[\text{OH}^-] \quad (6.61)$$

$$\lg R_x = \lg K_b + \lg [\text{OH}^-] = 14 - \text{pH} - \text{p}K_b \quad (6.62)$$

Следовательно, максимальное изменение R_x наблюдается при $\text{pH} = 14 - \text{p}K_b$. Для обращенно-фазовых колонок на основе силикагеля диапазон pH от 2 до 7 соответствует основаниям с $\text{p}K_b$ от 7 до 12. Для таких очень слабых оснований pH является важным параметром. Намного более сильные основания ($\text{p}K_b < 6$) в аналогичных условиях практически полностью протонированы. На химически связанных фазах на основе силикагеля ионизацию этих соединений подавить невозможно и их следует разделять как ионы, используя либо ион-парную, либо ионообменную хроматографию.

В последнее время много внимания уделялось разработке обращенно-фазовых систем, которые можно было бы применять в широком диапазоне pH. Потенциально для этого пригодны органические полимерные материалы, углеродные носители и модифицированный оксид алюминия. Понятно, что такие неподвижные фазы более всего подходят для разделения соединений основного характера.

Если в ПФ присутствует буфер, то диссоциация образца контролируется $\text{p}K_a$ буфера. Из-за ограниченного диапазона pH, допускаемого при разделении на неподвижных фазах на основе силикагеля, буферными соединениями могут быть только слабые кислоты. Рассмотрим в качестве примера диссоциацию слабой кислоты HA в присутствии буферной кислоты HB.

Можно написать такое уравнение [55]:

$$R_a = (K_{a,A}/K_{a,B})R_b = K_{AB}R_b, \quad (6.63)$$

где $K_{a,A}$ – константа диссоциации образца, $K_{a,B}$ – константа диссоциации буфера, R_b – степень диссоциации последнего, а K_{AB} – постоянная величина. Следовательно, степень диссоциации A пропорцио-

нальна степени диссоциации буфера. Отношение R_b – более приемлемая для практических целей величина, чем рН любых подвижных фаз, кроме чистой воды. В таких подвижных фазах трудно определить рН, а соотношение соли и кислоты, из которых приготовлен буфер, известно.

Если предположить, что скорости установления кислотно-основного равновесия достаточно велики, так что этот процесс можно считать протекающим мгновенно, тогда для наблюдаемого фактора удерживания $k_{набл}$ способного к ионизации соединения, например для слабой кислоты НА, можно записать уравнение:

$$k_{набл} = (k_{НА} + k_A K_{AB} R_b) / (1 + K_{AB} R_b) \quad (6.64)$$

Это уравнение описывает связь между удерживанием и степенью диссоциации буфера для слабых кислот. Аналогичное уравнение можно получить для слабых оснований.

Для характеристики удерживания как функции рН при значениях последнего, близких к рК образца, получены сложные сигмоидные кривые [55]. В этом диапазоне невозможна простая аппроксимация, необходимо определить экспериментально как минимум 3 параметра уравнения (6.64) для данного анализита.

Двух- или трехосновные кислоты и основания по своим свойствам не слишком отличаются от одноосновных. Наиболее важна та ступень равновесия, на которой одна из двух находящихся в равновесии форм ионизирована, а другая нейтральна. В ОФХ в большинстве случаев как однозарядные, так и многозарядные ионы имеют незначительные факторы удерживания по сравнению с нейтральными молекулами. Следовательно, всеми константами диссоциации, кроме одной, чаще всего можно пренебречь.

Если рассматривать разделение, основанное на ионном характере образца, то, напротив, надо придавать большее значение возможности образования многозарядных ионов. Особое положение занимают полиэлектролиты – соединения, содержащие большое число способных к ионизации групп, каждую из которых можно рассматривать либо как слабую кислоту, либо как слабое основание. Однако наличие большого числа функциональных групп приводит к тому, что величина суммарного заряда молекулы может непрерывно меняться от большого положительного значения при низких рН до большого

отрицательного значения при высоких рН. Наглядным примером таких полиэлектролитов служат белки. При некотором значении рН суммарный заряд молекулы равен нулю. Это не означает, что в молекуле отсутствуют заряженные функциональные группы. Просто общее число положительных зарядов становится равным общему числу отрицательных зарядов. Эту точку называют изоэлектрической, а значение рН, при котором суммарный заряд молекулы равен нулю, обозначают как pI. Удерживание полиэлектролитов меняется во всем диапазоне рН. При этом необходимо отметить, что их хроматографическое поведение носит сложный характер. Вообще вычлнить какие-то отдельные механизмы удерживания из их совокупности удается очень редко. При хроматографическом разделении белков могут одновременно играть роль и ионные механизмы, и физико-химические взаимодействия, и эксклюзионные эффекты.

Что касается *ионной силы* элюента, то она также влияет на удерживание как заряженных, так и нейтральных соединений. Применительно к незаряженным молекулам влияние возрастания ионной силы элюента можно представить как результат увеличения полярности подвижной фазы, приводящего к увеличению удерживания (“эффект высаливания”).

Для количественного описания влияния ионной силы элюента на удерживание заряженных соединений можно использовать уравнение Дэвиса [55]:

$$\lg k = \lg k_o - (Az^2 I^{1/2}) / (1 + I^{1/2}) + 0.04 z^2 I, \quad (6.65)$$

где k_o – коэффициент емкости при нулевой ионной силе, A – константа, зависящая от температуры (равна 0.512 при 25 °С), z – заряд иона анализируемого соединения и I – ионная сила. Из этого уравнения следует, что ионная сила оказывает одинаковое влияние на соединения, несущие одинаковый заряд. Поэтому для изменения хроматографической селективности можно использовать ионную силу только в том случае, если разделяемые соединения имеют различный заряд.

В работе [406] подробно рассмотрены экспериментальные зависимости параметров удерживания слабых кислот и оснований в условиях ОФХ от рН и соотношения воды и ацетонитрила в ПФ, проверены различные модели и уравнения, описывающие эффект рН на

удерживание. В [406] показано, что имеет значение, в какой шкале измеряется рН. Можно использовать рН, измеренную в воде (w_pH), или рН в подвижной фазе, для которой вода рассматривается как стандартное состояние растворителя (s_pH), наконец, третья шкала рН получается, если фактическая ПФ сама является стандартным состоянием растворителя (s_pH), именно две последние шкалы рекомендованы ИЮПАК для измерения рН в неводных и смешанных растворителях. Вместе с тем, в хроматографической практике привыкли оперировать значениями w_pH , несмотря на то, что они не отражают реальной величины pK_a в смешанном растворителе.

В [406] как раз демонстрируется факт хорошей аппроксимации экспериментальных данных зависимостями типа (6.66), если применяются шкалы s_pH и s_pH . Для примера на рис. 6.25. приведены

Таблица 6.30. Величины рН для некоторых буферных систем, измеренные в разных шкалах

Водный буфер	w_pH	Объемная доля ацетонитрила, %					
		20		40		60	
		s_pH	s_pH	s_pH	s_pH	s_pH	s_pH
0.01 M H_3PO_4	2.00	2.07	2.10	2.20	2.34	2.24	2.70
$6.40 \cdot 10^{-3}$ M Cit – $3.60 \cdot 10^{-3}$ M KH_2Cit^*	3.00	3.24	3.27	3.53	3.67	3.77	4.23
$9.35 \cdot 10^{-3}$ M KH_2Cit – $6.52 \cdot 10^{-3}$ M $KNaHCit$	3.99	4.31	4.34	4.70	4.84	5.13	5.59
$3.46 \cdot 10^{-3}$ M HAc – $6.54 \cdot 10^{-3}$ M NaAc**	5.00	5.38	5.41	5.99	6.13	6.35	6.81
$5.81 \cdot 10^{-3}$ M $KNaHCit$ – $4.19 \cdot 10^{-3}$ M Na_3Cit	6.01	6.49	6.52	6.89	7.03	7.11	7.57
$5.22 \cdot 10^{-3}$ M KH_2PO_4 – $4.78 \cdot 10^{-3}$ M Na_2HPO_4	7.01	7.43	7.46	7.80	7.94	8.02	8.48
$9.44 \cdot 10^{-4}$ M KH_2PO_4 – $9.06 \cdot 10^{-3}$ M Na_2HPO_4	8.02	8.41	8.44	8.62	8.76	8.99	9.45
$5.95 \cdot 10^{-3}$ M H_3BO_3 – $4.05 \cdot 10^{-3}$ M NaH_2BO_3	9.01	9.78	9.68	10.25	10.39	10.74	11.20
$7.84 \cdot 10^{-3}$ M $BuNH_3^+$ – $2.16 \cdot 10^{-3}$ M $BuNH_2$	10.03	9.65	9.81	9.52	9.66	9.36	9.82
$1.64 \cdot 10^{-3}$ M $BuNH_3^+$ – $8.36 \cdot 10^{-3}$ M $BuNH_2$	11.01	10.84	10.87	10.73	10.87	10.42	10.88
0.01 M Na_3PO_4	12.04	12.38	12.41	12.70	12.84	13.19	13.65

Примечания: * – цитратный буфер; ** – ацетатный буфер.

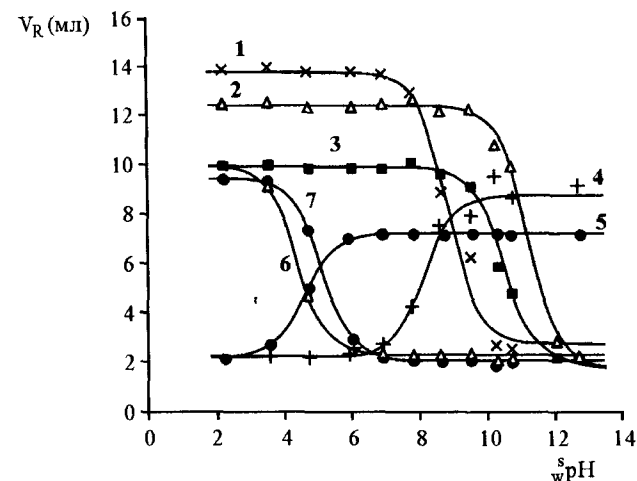


Рис. 6.25. Зависимость V_R некоторых кислот и оснований в 40 % ацетонитриле от рН элюента, измеренной после смешивания водного буфера с модификатором, стеклянным электродом калиброванным водными буферами: 1 – 2,4-дихлорфенол; 2 – 2-нафтол; 3 – 3-бромфенол; 4 – N,N-диметилбензиламин; 5 – *n*-толуидин; 6 – 2,4-динитрофенол; 7 – нафтойная кислота. Колонка (4.6x150 мм) с полимерным сорбентом PLRP-S 100 E, расход элюента 1 мл/мин [406]

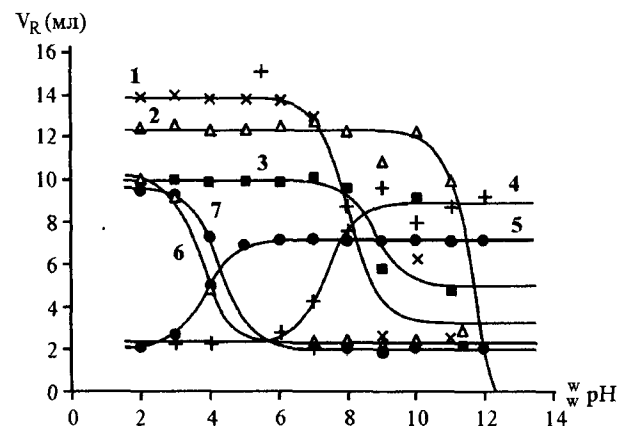


Рис. 6.26. Зависимость V_R слабых кислот и оснований в 40 % ацетонитриле от w_pH : 1 – 2,4-дихлорфенол; 2 – 2-нафтол; 3 – 3-бромфенол; 4 – N,N-диметилбензиламин; 5 – *n*-толуидин; 6 – 2,4-динитрофенол; 7 – нафтойная кислота. Сплошные линии – расчет по (6.66) [406]

кривые, рассчитанные по уравнению (6.66), наложенные на экспериментальные точки. В качестве шкалы использованы величины ${}_w^s pH$. При измерении pH до смешивания буферного раствора с ацетонитрилом наблюдаются заметные отклонения V_R (рис. 6.26) от полученных по (6.63) кривых. Это говорит о том, что целесообразно калибровать электрод в шкале ${}_w^s pH$ или ${}_s^s pH$. Наиболее прост и удобен вариант шкалы ${}_w^s pH$, хотя он менее точен, чем ${}_s^s pH$.

$$V_R = [V_{R(HA)} + V_{R(A)} 10^{pH - pK_o}] / (1 + 10^{pH - pK_o}) \quad (6.66)$$

Таким образом, при контроле влияния pH на параметры удерживания в водно-органических модификаторах следует обращать внимание на точность применяемой шкалы pH.

ГЛАВА 7. ХЕМОМЕТРИЧЕСКИЕ ПРИЕМЫ ОПТИМИЗАЦИИ СОСТАВА ПОДВИЖНОЙ ФАЗЫ

4.1. Хемометрика как раздел аналитической химии

Для успешной работы экспериментаторам необходимы методы математической статистики и компьютерная техника. История самолетостроения и жидкостной хроматографии начались одновременно – с 1903 года. Сейчас самолеты проектируются и управляются фактически при помощи компьютеров. То же самое можно сказать и о хроматографии. Современные хроматографы оснащены компьютерами с программным обеспечением, позволяющим автоматизировать управление компьютером и обработку хроматографических данных. Интенсивно разрабатываются хемометрические приемы переработки хроматографической информации. Методы хемометрики используются для получения ценной, но не всегда очевидной информации из экспериментальных данных. Часто хемометрика рассматривается как область химии, применяющая математико-статистические методы с целью получения оптимальными способами информации об изучаемых объектах.

Самой широкой областью применения методов хемометрики является аналитическая химия. Связь между аналитической химией и хемометрикой настолько тесна, что последнюю можно рассматривать как важнейший раздел аналитической химии. В аналитической химии используются хемометрические методы обнаружения и разрешения сигналов (фильтрация, сглаживание, развертка, преобразования и пр.), методы градуировки, контроля качества и управления процессом анализа вещества. С помощью хемометрики решаются задачи получения, обработки, классификации и интерпретации экспериментальных данных. Приемы хемометрики применимы на всех основных этапах анализа вещества. На стадиях пробоотбора и сокращения пробы применяют планы пробоотбора и рандомизацию, контрольные карты используются для прослеживания во времени за однородностью проб. При выборе метода устранения помех (операции маскирования, разделения и т. п.), полу-

чения выходного сигнала для измерения могут быть использованы комбинаторный перебор и отсеивание. Для поиска оптимальных условий получения выходного сигнала применимы методы планирования экстремального эксперимента. При этом для выбора отклика (параметра оптимизации) используются рекомендации по метрологической оценке результатов анализа. В круг задач хеометрики попадают задачи химической метрологии, оценки повторяемости и межлабораторной воспроизводимости.

Специфика применения хеометрики состоит в обработке больших массивов информации, в поиске и оценке связи между переменными, в использовании компьютерной техники для интерпретации. Для многих направлений химии методы хеометрики являются эффективным инструментом количественного анализа результатов [245,369-374,408-411]. Статистические методы планирования эксперимента позволяют значительно повысить результативность научных исследований. Следует отметить, что приемы статистического анализа, несмотря на их общность, должны разрабатываться в соответствии с задачами каждой дисциплины. Свои специфические особенности в статистической обработке данных, в анализе моделей “строение аналита – параметры удерживания – неподвижная фаза – подвижная фаза” имеет жидкостная хроматография [78,367,412-417]. Более того, модели систем для разных вариантов хроматографии имеют кардинальные отличия друг от друга.

Наибольшее распространение в хеометрике имеют следующие задачи: статистическая обработка экспериментальных данных; планирование эксперимента и оптимизация; моделирование и оценка параметров; получение количественных соотношений “структура – хроматографические свойства”. В последнее время активно разрабатывается математическое и программное обеспечение для распознавания образов веществ по набору аналитических данных. В отдельное направление выделяются исследования по искусственному интеллекту и экспертным системам на базе искусственных нейронных сетей [410].

Основное место в хеометрических приемах занимают методы многомерного статистического анализа. Это параметрические, непараметрические и робастные методы обработки результатов; регрессионный, дисперсионный и корреляционный анализы; метод

главных компонент; дискриминантный; кластерный и факторный анализы. К этой группе методов примыкают методы планирования эксперимента и оптимизации, а именно методы планирования экстремальных экспериментов, методы планирования отсеивающих экспериментов, последовательный симплексный метод, методы обобщенных критериев и обобщенных функций.

Хеометрика ввела в практику химиков “многофакторное мышление” – принципиально новое положение в науке. Многофакторное мышление позволяет более полно учитывать факторы, определяющие максимальную эффективность управляемого химического процесса. Эта дисциплина обуславливает возрастающий интерес как к новым, так и к уже полученным и доказавшим свою эффективность эмпирическим и полуэмпирическим моделям. Разработано множество способов формализации для разных постановок задач. Это делает виртуальные математические методы реалистичными и пригодными для практического применения. Вместе с тем остаются эвристические, неформализованные этапы, к которым относится собственно постановка задачи, выбор математической модели, выбор области проведения опытов, граничных условий, которые может грамотно поставить только специалист, понимающий физический, химический или технологический смысл факторов и параметров исследуемого с помощью хеометрики процесса.

Математические модели изучаемых объектов можно разделить на два класса: описательные (феноменологические) и теоретические (нормативные). Описательные модели используются для свертывания и компактного представления экспериментальных данных без изучения механизма процесса. В этом и состоит одна из задач математической статистики, определяемой иногда как наука о редукции данных. Такой подход имеет безусловные достоинства для практика. Зная эмпирические закономерности, имея формулу, описывающую, например, изменение элюирующей силы при варьировании состава подвижной фазы, изотерму или изобару того или иного свойства, легко найти нужное решение, подставив в формулу соответствующее значение независимой переменной величины. Статистические модели, полученные на первых этапах исследований, дают возможность не только эффективно решать практические

кие задачи, но и зачастую облегчают решение теоретических проблем, помогают выяснить механизм явлений.

Простота получения статистических моделей особенно заметна при сопоставлении с трудностями получения нормативных моделей. Например, при построении моделей хроматографических процессов приходится иметь дело с “джунглями” сложных дифференциальных уравнений, с их численным интегрированием, параметрической нелинейностью и пр. Информация по физико-химическим свойствам сорбентов, термодинамическим и кинетическим характеристикам сорбции, химическим свойствам сорбатов и подвижных фаз не всегда теоретически упорядочена. Поэтому разные исследователи для одного и того же хроматографического процесса могут предлагать существенно отличающиеся модели. Формализация исходной информации (представление ее в виде компактной и содержательной теоретической модели) превращается в сложную задачу. На ее решение может потребоваться неоправданно много времени.

Физическое описание явления и его математическая модель имеют самостоятельное значение и в то же время дополняют друг друга. Создание физического описания связано с качественным подходом и игнорированием деталей, что снижает математическую точность. Уточнение математического описания в свою очередь затрудняет физическое описание. В хеометрике можно выделить аналитический и синтетический подход. В первом случае изучают объект разбиением его на части, во втором случае свойства объекта изучают в целом. Первый подход ставит своей задачей объяснение специфики поведения объекта. Но эта задача не может быть решена без второй эвристики, которой отводится роль первоначального изучения объекта. Главное состоит в том, чтобы не противопоставлять эти две познавательные установки, что на практике довольно часто имеет место.

Традиционно требования к математическому описанию явлений оформлялись в виде законов, которые признавались безусловно верными при данном уровне знаний. Закон мог быть проверен и результаты проверки интерпретировались однозначно. Другие требования предъявляются к математическим моделям сложных систем. Модели дают ограниченную информацию. Одни и те же свойства объекта можно представить разными моделями. Взять, к примеру, полярность

растворителя. Существует несколько десятков шкал полярности. Хорошее совпадение с экспериментальными данными не является строгим критерием правильности модели, так как можно предложить и другие модели, хорошо описывающие результаты. В этом случае сохраняет свое значение принцип “лезвия Оккама”. При одинаковой степени аппроксимации предпочтение следует отдавать более простой (редуктивной) модели, менее дифференцированной, имеющей меньшее число эмпирических коэффициентов и т.п.

В физической химии широко применяются дифференциальные уравнения, описывающие изменения свойств веществ в системе с устойчивой структурой. Устойчивость задается значениями фундаментальных физических констант. Нормативное моделирование основано на гипотезе, что изучаемые иерархические системы хорошо организованы, они состоят из устойчивых структур, поддающихся алгоритмическому описанию. По всей видимости, в химии растворов и в жидкостной хроматографии системы чрезвычайно сложны, не имеют четких границ, они находятся в непрерывном взаимодействии. Поэтому разработка эмпирических правил, нахождение корреляций в экспериментальных данных вполне оправданно, даже если не удастся найти убедительные теоретические модели.

Применение методов хеометрики представляется целесообразным при решении следующих задач жидкостной хроматографии:

- 1) упорядочить подход к разработке хроматографических методик;
- 2) провести экспертизу оптимальности выбранных условий хроматографии, исходя из свойств аналита и возможностей хроматографического оснащения;
- 3) усовершенствовать методику, используя процедуры оптимизации;
- 4) сократить расход материалов и времени при экспериментальном подборе приемлемых условий хроматографии, опираясь на ранее найденные эмпирические модели и априорные расчеты.

Определение набора правил, упорядоченный подход к разработке хроматографических методик полезен, прежде всего, для начинающих хроматографистов. Высокоэффективная жидкостная хроматография является сложным методом, для которого не удастся создать универсальной экспертной компьютерной системы, позволяющей по базе данных выдавать однозначные рекомендации. До сих

пор опытные специалисты полагаются на свои многолетние эмпирические знания и мастерство. Вместе с тем использование рутинных алгоритмов, готовых баз данных и экспертных оценок повышает эффективность работы и специалистов высокого уровня, позволяет им усовершенствовать готовые разработки. Необходима система оценки качества хроматографической методики. Системы управления качеством широко внедряются во все сферы мирового промышленного производства, обязательным компонентом которого является контроль входного сырья и выходного продукта, аналитический контроль на разных стадиях производства. Для некоторой продукции расходы на выполнение инструментальных измерений, контролирующих качество изделия, составляют до 30% от себестоимости. Внедрение системы качества, базируется на оптимизации всех процедур, что позволяет сократить издержки на 10 – 50 %.

Этапы последовательного подхода к решению задач хроматографического разделения рассмотрены в работе Схунмакерса [55]. На первом этапе требуется *получение первичной информации об образце* (аналите) – предположительный состав, тип определяемого компонента, уровень его концентрации, растворимость в хроматографических растворителях, наличие и характер загрязнений, побочных продуктов, физико-химические свойства, определяющие способ детектирования. На втором этапе целесообразно *изучить литературу и электронные базы данных*, чтобы не тратить времени на изобретение колеса. Очевидно, существует возможность стандартизации хроматографической информации. Базы данных позволяют по ключевым словам легко найти существующие разработки. Пример такой формализованной базы данных по ВЭЖХ лекарственных препаратов приведен в работе Шатца и Сахартовой [13]. Поскольку описанные в литературе методики не всегда точно воспроизводятся, существует разница между образцами аналитов, невозможно точно воспроизвести саму хроматографическую систему, поэтому литературные данные следует рассматривать в качестве отправной точки для последующей оптимизации. Затем следует *выбор хроматографического метода*. Этот выбор основывается не только на хроматографических свойствах аналита, но и на наличии соответствующего хроматографического оборудования, а также исходя из технико-экономических соображе-

ний. Чем меньше требуется времени, трудозатрат, расхода реактивов, чем проще пробоподготовка и сама методика при заданном уровне чувствительности детектирования, чем доступней аппаратное оформление, тем предпочтительней метод хроматографии. На этом этапе из хеометрических приемов наиболее подходит *оптимизация по критериям желательности* [369] или по *обобщенным критериям* [418]. Если известны функциональные зависимости хроматографических свойств от варьируемых параметров хроматографической методики, возможно применение *оптимизации по обобщенным целевым функциям* [418]. Далее выполняется *запись хроматограммы* в виде файла или графического изображения на бумаге. Если выбран конкретный способ разделения, по литературным источникам определяют, какие параметры влияют на эффективность и селективность разделения в выбранном режиме хроматографии. Если можно избежать программирования состава элюента, температуры и тем более скорости потока подвижной фазы, следует предпочесть изократический вариант разделения. После записи хроматограммы при недостаточном уровне разрешения придется оптимизировать процесс разделения. Необходимо будет привести факторы удерживания компонентов аналита к желаемым пределам. Оптимальным считается диапазон $1 < k < 10$. Если образец содержит небольшое количество компонентов, диапазон варьирования k можно сузить от 1 до 5 или от 0.5 до 2. Оптимизация за счет качества колонки, т.е. числа теоретических тарелок, связана со значительным увеличением стоимости разделения. Следовательно, эта крайняя мера в оптимизации, предпочтение же следует отдавать типовым колонкам. Селективность разделения можно менять либо варьируя состав подвижной фазы, либо меняя сорбент. Последний прием менее желателен по экономическим соображениям. Изозлюотропные составы, как показано в предыдущих разделах, можно определять по корреляциям между элюирующей силой и составом элюента, найденным по большому массиву экспериментальных данных, либо используя обобщенные критерии полярности.

Возможны разные уровни решаемых хроматографических задач. Высший уровень – это разработка принципиально новой методики, научные исследования неизученного многокомпонентного объекта. Он требует совершенного, гибкого, подчас гибридного оборудова-

ния. Второй уровень – сложные случаи анализа, требующие программирования условий хроматографирования, высокую степень автоматизации. К третьему уровню аппаратурной оснащённости методики анализа можно отнести выполнение анализов на типовых приборах с детекторами общего назначения, со стандартным набором колонок и общедоступными растворителями. Мы рассматриваем в первую очередь оптимизацию методик третьего уровня.

7.2. Экспертные системы в жидкостной хроматографии

Простые схемы выбора системы фаз приведены на рис. 4.1-4.4. Эти схемы основываются на логических посылах и на накопленном опыте. Если мы имеем дело с новыми типами исследуемых соединений, альтернативой такому подходу может служить изучение литературных данных либо консультации у специалистов. Можно попытаться формализовать опыт специалистов и литературные данные, записав имеющуюся информацию и набор правил в виде компьютерной программы, называемой “Экспертной системой”. Такие экспертные системы созданы практически для каждого аналитического метода. Активно они разрабатываются и для жидкостной хроматографии [55,367,373,412-418]. Выбор наиболее подходящей системы фаз достаточно сложен. В наибольшей степени он определяется свойствами образца и аналитическими требованиями. Однако немаловажную роль могут играть и вторичные факторы такие, как наличие колонок и материальное обеспечение исследований, а также накопленный опыт и личные симпатии исследователя. Поскольку принятие решения зависит от многих факторов, в том числе и достаточно субъективных, разработка экспертных систем для выбора хроматографических фаз – задача достаточно сложная. Принято считать, что если компьютерная программа позволяет “решать существенные проблемы”, только тогда ее можно классифицировать как “экспертную”.

Даже если экспертные системы являются удачными, они не избавляют от необходимости оптимизировать селективность. Эти программы играют дополнительную роль и обеспечивают основу для соответствующих начальных экспериментов, исходя из результатов которых проводится дальнейшая оптимизация разделения. Наиболее продвинутым

пакетом прикладных программ, используемых в аналитической жидкостной хроматографии, является DryLab 2000 Plus фирмы LC Resources Inc. [383]. Эта программа постоянно совершенствуется в результате интернационального и междисциплинарного сотрудничества большой группы ученых уже 17 лет. В [365,383,416] приведена богатая библиография, в которой обсуждены возможности разных версий DryLab и математико-статистических методов и концепций, заложенных в этот пакет программ. DryLab имеет множество приложений в хроматографической лаборатории. Программа позволяет за короткое время оптимизировать разделение аналитов как в условиях ОФХ, так и НФХ, прогнозирует ошибкоустойчивость методики, моделирует удерживание в изократическом и градиентном режиме ОФХ для бинарных и тройных подвижных фаз, находит оптимум pH, ионной силы, оптимизирует температурную программу, определяет эффект влияния замены колонки, размера частиц, объемной скорости потока. Причем оптимизация может осуществляться в двухпеременном режиме. Одновременно можно варьировать обращенно-фазовый изократический состав и температуру, градиент состава и температуру, изократический и градиентный состав подвижной фазы и величину pH. По образцовым измерениям параметров удерживания критической пары аналитов DryLab проектирует линейные или сегментированные градиенты. В настоящее время пакет DryLab активно адаптируется к капиллярному электрофорезу. Наименее разработана экспертная система для условий НФХ. Парадокс состоит в том, что при более легкой интерпретации механизма адсорбционной хроматографии, по сравнению с механизмом удерживания в обращенно-фазовой хроматографии, предсказать поведение смеси аналитов по эмпирическим моделям в условиях ОФХ гораздо легче, чем в условиях НФХ. Поэтому имеющиеся программы ориентируются преимущественно на ОФХ. Этот метод предпочтительней и по ряду технико-экономических соображений.

Еще один пакет программ ElueX 5 фирмы CompuDrug International Inc. [419] прогнозирует влияние состава подвижной фазы (концентрации органического модификатора, величины pH) на фактор удерживания k и симметричность пиков. Программа моделирует хроматограмму после того, как заданы две экспериментальные точки, для всех возможных значений объемной доли модификатора. Учитывая хими-

ческую структуру аналитов, экспертная система предлагает стартовый состав подвижной фазы априори, без выполнения эксперимента. Этот состав стремится обеспечить величину *Igk* между определенными пользователем пределами при соблюдении симметричности пиков и хорошего разделения аналитов. Программа позволяет находить optimum условий разделения по 2-3 экспериментальным данным, если есть необходимость, программа предложит градиентный режим.

Экспертную систему ChromSword Auto предлагает фирма Agilent Technologies Inc. [420]. Пакет программ ориентирован, как и в предыдущих случаях, в первую очередь, на оптимизацию условий ОФХ. Программное обеспечение использует физико-химическую модель удерживания, производную от свойств или структурных формул аналитов и характеристики колонки. Оно предназначено для минимизации числа опытов и оптимизации методики, исходя из теоретически предсказанного оптимального метода. С возможностями данной экспертной системы можно ознакомиться в публикациях [417,420].

Упомянем мощное программное обеспечение TurboSEQUENT для идентификации протеинов [421], которое отвечает самым высоким требованиям к экспертным системам. TurboSEQUENT – это программное обеспечение второго уровня, работающее в оболочке Xcalibur, которое автоматически идентифицирует протеины путем сравнения экспериментальных данных tandemной масс-спектрометрии (MS/MS) со стандартными базами данных по протеинам и ДНК. Программное обеспечение, поддерживаемое масс-спектрометрическим пакетом программ Xcalibur, устанавливается на системах Thermo Finnigan LC/MS/MS и обеспечивает быстрое и высокоточное решение задачи идентификации белков и пептидов. TurboSEQUENT коррелирует не интерпретированные масс-спектры пептидов из баз данных по протеинам и нуклеотидам. При помощи пакета программ оперативно определяется аминокислотная последовательность и устанавливаются белки и микроорганизмы, которым соответствуют масс-спектры анализируемых пептидов. Программное обеспечение может анализировать одиночный спектр или всю пептидную карту данных LC/MS/MS автоматически. Особенным достоинством TurboSEQUENT является возможность прямого анализа протеинов в смесях. Смесь протеинов анализируется высокоспецифичным методом tandemной масс-спектрометрии.

Информация по фрагментации, происходящей в масс-спектрометре, конвертируется в точные массы пептидов и информацию по последовательностям. Идентификационный алгоритм “перекрестной корреляции” TurboSEQUENT может извлекать информацию и правильно идентифицировать протеины даже при низких концентрациях, при которых сигнал очень слаб. Эта характеристика в особенности полезна тогда, когда доступное количество образца протеинов лимитировано и соотношение сигнал/шум мало. Очевидно, что большие достижения в создании экспертных систем в области жидкостной хромато-масс-спектрометрии связано с большими финансовыми вливаниями в научные программы по генетике и биотехнологии.

7.3. Базы данных по жидкостной хроматографии

Экспертные системы представляют собой тандем из пакета исполнительных программ и пакета баз данных. Базы данных имеют самостоятельное значение как архивы хроматографической информации. Производители хроматографической продукции комплектуют приборы программным обеспечением, в котором предусмотрено сохранение хроматограмм, таблиц пиков, условий анализа, отчетов и т.д. Таким образом, каждая лаборатория со временем накапливает собственную базу данных. Вместе с тем, обмен такими базами затруднен, так как программное обеспечение не унифицировано и очень разнообразно. Фирмы поставляют хроматографические базы данных на CD-дисках, основным недостатком которых является невозможность переноса базы на жесткий диск и пополнения этой базы данных в ее собственной оболочке.

Сейчас актуальной задачей является стандартизация методологии архивирования хроматографических данных. Разработка стандартных хроматографических файлов существенно упрощает возможности передачи и обмена информации между хроматографистами. К сожалению, программное обеспечение различных производителей направлено главным образом на улучшение точности, эффективности и производительности работы аналитика на конкретном приборе. Развитие универсального программного обеспечения дорогой проект, не очень выгодный приборным изготовителям.

База данных должна быть способна к сохранению всех аспектов хроматографической методики, а именно свойств аналита, матрицы в которой его определяют, характеристик колонки, растворителей, градиента, детектирования, примечаний, ссылок и т.д. Хромограмма должна быть записана в базе данных как изображение или объект OLE, или метафайл, которые через буфер обмена можно копировать и вставлять в рабочую программу хроматографа, в текстовые и табличные редакторы. При этом важно, чтобы файл хромограммы был небольшого размера (около 30 кб). Зачастую размер файлов хромограмм в настоящее время составляет 300-500 кб. Важно не только сохранить файлы, но и сделать удобной и многовариантной систему поиска информации в базе данных (по наименованию аналита, брутто-формуле или структуре). База данных должна позволять импортировать и экспортировать информацию, быть совместимой с операционной системой Windows.

В настоящее время разрабатываются программы, адаптированные под накопление хроматографической информации и способные копировать изображение и отчеты в текстовые редакторы, HTML-редакторы и электронные таблицы. При этом сохраняется возможность редактировать хромограмму (отчет, вид изображения, шкалу, нумерацию пиков и т.п.). В качестве примера такой программы можно назвать программу Chrom Merge, распространяемую фирмой LC Resources Inc. [383]. Она полностью совместима со средой Windows, с широко известными офисными пакетами программ Word и Excel. Программа оперирует стандартизированными данными в формате Andi (Analytical data interchange), она конвертирует файлы в форматы программного обеспечения 10 наиболее распространенных программ обработки хроматографических данных.

Другой интересной и полезной программой для жидкостной хроматографии является программа HPLC Column Manager 5, предлагаемая фирмой Limathon Limited. Это программное обеспечение разработано для учета и контроля над работой колонок. В оболочке HPLC Column Manager 5 фиксируются все данные о колонках. На основе внесенных данных по критериям, определенным пользователем, программа выдает рекомендации, какую колонку применить для разделения аналитов. В программу подключены десять

баз данных по типам сорбентов, поиску и устранению неисправностей, смешиваемости растворителей и т.д. Программа совместима с базой данных ChromView, в которую включено около 5000 примеров анализа методом ВЭЖХ для 20000 аналитов [422].

Следует отметить, что для создания баз данных и выполнения рутинных оптимизационных процедур могут быть использованы и типовые неспециализированные офисные программы Microsoft Access и Microsoft Excel. Поэтому ниже мы рассмотрим некоторые алгоритмы поиска оптимальных решений с применением общедоступного программного обеспечения.

7.4. Обобщенные критерии подбора оптимальных растворителей

Задача сравнения и выбора вариантов в практике хроматографиста возникает очень часто. Так, в монографиях, описывающих применение метода ВЭЖХ, отсутствуют количественные подходы к выбору оптимальных растворителей для решения конкретных аналитических задач. В них, как правило, приводятся сводные таблицы физико-химических параметров хроматографических растворителей и указываются желательные или критические значения этих параметров. При разработке рутинных методик анализа для заводской лаборатории или сертификационного центра, при комплектации типового рабочего места аналитика-хроматографиста также полезен обоснованный выбор ассортимента и требуемого количества растворителей для ЖХ. Из списка примерно в 100 растворителей, пригодных для разных вариантов ЖХ, в лаборатории, как правило, достаточно иметь 10-15 растворителей, чтобы реализовать основные режимы хроматографии. Тем более что многие растворители вполне можно заменять другими, близкими по хроматографическим свойствам. Дорогие хроматографические приборы, изготовленные по новейшим технологиям, например, система "Альянс 2690" (Уотерс, США), благодаря конструкционным особенностям, в частности, системе подачи растворителя с полностью независимыми приводами поршней с цифровым управлением, встроенному вакуумному дегазатору и т.д., надежно работают с растворителями различной летучести, вязкости и плотности. Данные свойства растворителей не критичны для хроматографов этого клас-

са. Напротив, для сравнительно недорогих микроколоночных хроматографов со шприцевым насосом среднего давления и упрощенной тем самым конструкцией (хроматографы серии “Милихром” и “Обь”) свойства растворителей, влияющие на механическую работу хроматографа, приобретают решающее значение. С другой стороны, современная тенденция на переход к сорбентам с размером частиц 1.5-3 мкм опять возвращает нас к внимательному выбору ПФ. Токсичность, воспламеняемость, температура кипения и стоимость растворителей являются критическим моментом при выборе растворителей для препаративной и полупрепаративной ВЭЖХ. Микроколоночные хроматографы, наоборот, экономичны и относительно безопасны, благодаря малому расходу ПФ. При использовании спектрофотометрических детекторов (СФД) безразличен показатель преломления, при регистрации хроматограмм рефрактометрическим детектором (РМД) игнорируется поглощение ПФ в УФ свете. Совместимость с разбавителем (гидрофильность или липофильность) важна при выборе режима хроматографии – НФХ или ОФХ, при составлении бинарных или многокомпонентных ПФ, при градиентном режиме элюции. Не последнее значение имеет хорошая растворимость анализов в растворителе. Ни один индивидуальный растворитель не обладает универсальными хроматографическими свойствами. Идеальный гипотетический растворитель для ВЭЖХ (*menstruum universale*) должен сочетать в себе свойства нескольких растворителей совершенно различной природы!

Многopараметрическая оптимизация представляет собой попытку найти некоторый компромисс между теми параметрами, по которым требуется оптимизировать решение [423,424].

Рассмотрим количественную оценку вариантов по обобщенному критерию. Этот критерий определяют по уравнению (7.1)

$$K_s = \sum_{i=1}^m a_i (x_i^s / x_i^n), \quad (7.1)$$

где K_s – значение обобщенного критерия для s -го варианта, a_i – коэффициент веса i -го параметра, x_i^s – значение i -го параметра для s -го варианта, x_i^n – нормирующее значение для i -го параметра, m – количество параметров.

Важным элементом при такой оптимизации является назначение коэффициентов веса каждого оптимизируемого параметра. Рас-

пространенный метод – определение коэффициентов веса с помощью экспертов. Методы экспертных оценок широко распространены. Нет основания считать неприемлемым коллективное решение специалистов при принятии оптимальных решений.

Наиболее известны три метода экспертной оценки: непосредственное назначение коэффициента веса, оценка важности параметров в баллах и метод парных сравнений.

При непосредственном назначении коэффициентов каждый эксперт оценивает сравнительную важность рассматриваемых параметров, которые будут входить в обобщенный критерий. В этом методе каждый i -ый эксперт для каждого k -го параметра должен назначить коэффициент веса a_{ik} таким образом, чтобы сумма всех коэффициентов веса, назначенных одним экспертом для различных параметров, равнялась единице. Это требование можно записать так:

$$\sum_{k=1}^n a_{ik} = 1; \quad i = 1, n, \quad (7.2)$$

где n – число экспертов. Усредненные значения a_i применяют в дальнейших расчетах. Чтобы определить, насколько согласованы оценки экспертов, находят коэффициент вариации, равный отношению среднего a_i к величине стандартного отклонения:

$$V = \bar{a}_i / S_i \quad (7.3)$$

$$S_i = \sqrt{\frac{n \sum a_i^2 - (\sum a_i)^2}{n(n-1)}} \quad (7.4)$$

Значения коэффициента вариации показывает величину разброса экспертных оценок. При $V \leq 0.2$ оценки экспертов можно считать согласованными. В случае $V > 0.2$ целесообразно провести с экспертами содержательное обсуждение важности оцениваемых параметров, после чего повторить экспертизу. При сохранении величины разброса целесообразно учитывать вероятностный характер экспертных оценок. В табл.7.1. представлен пример нахождения этим методом весовых коэффициентов трех параметров растворителей для ВЭЖХ.

При оценке важности параметров в баллах каждый эксперт оценивает параметры по десятибалльной системе. При этом оценка, назначаемая каждым экспертом каждому параметру, не связана с

Таблица 7.1. Пример прямого назначения весовых коэффициентов экспертами

Эксперт	Обобщаемые параметры			Σa_i
	Вязкость	Прозрачность в УФ свете	Стоимость	
1	0.2	0.5	0.3	1.0
2	0.3	0.5	0.2	1.0
3	0.4	0.2	0.4	1.0
4	0.3	0.2	0.5	1.0
5	0.2	0.4	0.4	1.0
6	0.4	0.3	0.3	1.0
7	0.3	0.3	0.4	1.0
8	0.2	0.5	0.3	1.0
$\overline{a_i}$	0.29	0.36	0.35	1.0

оценками, которые он же назначает другим параметрам. Например, всем параметрам можно назначить одинаковую оценку. Определение экспертных оценок в баллах производится по следующему алгоритму. Сформировать в таблицу (табл. 7.2.), в которую вносятся оценки всех параметров в баллах, сделанные каждым экспертом. Табличный процессор рассчитывает отношение балла к сумме баллов $N_i/\Sigma N_i$ для каждого параметра и эксперта, что обеспечивает переход от оценок параметров в баллах к значениям коэффициентов веса, сумма которых для всех параметров равна единице у любого эксперта. Так, для первого эксперта вязкость имеет весовой коэффициент $a_i=6/25=0.24$. В итоге получают средние значения, которые проверяются на вариабельность по соотношению (7.4).

При оценке коэффициентов a_i методом парных сравнений каждый эксперт заполняет отдельную таблицу (табл. 7.3.). Пусть число параметров $k=5$, а число экспертов $n=4$. Если k -ый параметр важнее j -го, то в ячейке, принадлежащей k -ой строке и j -му столбцу, указывается 1, в противном случае – 0. Для каждой строки находят частные суммы N_j , которые, в свою очередь, суммируют в ΣN_j . В примере для вязкости $N_j=0+1+1+0=2$.

Таблица 7.2. Пример оценки весовых коэффициентов экспертами по балльной системе

Эксперт	Оценка в баллах N_i				Сумма баллов ΣN_i
	Вязкость	Прозрачность в УФ свете	Токсичность	Стоимость	
1	6	7	5	7	25
2	10	8	4	9	31
3	5	7	6	8	26
4	7	9	5	7	28
5	8	6	4	6	24
	a_i				Σa_i
1	0.24	0.28	0.20	0.28	1.0
2	0.32	0.26	0.13	0.29	1.0
3	0.19	0.27	0.23	0.31	1.0
4	0.25	0.32	0.18	0.25	1.0
5	0.33	0.25	0.17	0.25	1.0
$\overline{a_i}$	0.27	0.28	0.18	0.28	1.0

Пример заполнения такой таблицы первым экспертом приведен в табл. 7.3. Из нее видно, что по оценке эксперта вязкость менее важна, чем прозрачность в УФ свете и температура кипения (парные оценки 0;1), но более важна, чем токсичность и стоимость (парные оценки 1;0). Такую же таблицу заполняют все эксперты. В базовую таблицу для каждого критерия, определенного каждым экспертом заносится отношение $N_i/\Sigma N_i$. Искомый коэффициент веса равен среднему значению a_i (табл. 7.4.). Так, для вязкости в базовую таблицу (табл. 7.4) в строку для первого эксперта заносим значение $a_i=2/10=0.2$. Итоговое значение a_i для вязкости будет равно $(0.20+0.25+0.20+0.25)/4=0.23$. Для остальных критериев производится аналогичный расчет весовых коэффициентов. Алгоритм формирования таблиц в Excel, запись встроенных функций для определения весовых коэффициентов в транскрипции, принятой для этого процессора, приведен детально в [418].

Понятно, что при проведении рейтинга растворителей для различных вариантов ВЭЖХ весовые коэффициенты хроматографических

свойств растворителей будут разными. Чтобы отсечь заведомо неприемлемые свойства, в базе данных производят выборку растворителей по граничным условиям, используя опцию автофильтра. Например, для ВЭЖХ с УФ-детектором типичным граничным условием является порог прозрачности <254 нм. Следовательно, все растворители, имеющие более длинноволновый порог, отбрасываются из рассмотрения. Если из рассмотрения исключается параметр, ему в базовой таблице присваивается $a_i=0$. Так, при оценке пригодности растворителя для ВЭЖХ с УФ-детектором, можно игнорировать показатель преломления растворителя. В качестве нормирующего значения для i -го параметра x_i^n в уравнении (7.1) берутся оптимальные значения, характерные для некоторых растворителей из выборки.

В итоге получается сумма свойств оптимального гипотетического растворителя, у которого температура кипения, как у одного растворителя, плотность, как у другого, порог прозрачности, как у третьего и т.д. Нормы задаются экспертным способом, в простейшем случае можно взять усредненные значения параметра, удовлетворяющие граничным условиям. Например, при подборе растворителей для ВЭЖХ гидрофобных цветообразующих компонентов фотоматериалов в работе [324] применили граничные условия и нормы, представленные в таблице 7.5. Оптимизацию проводили по 9 показателям. Качественные показатели преобразовали в цифровую информацию следующим образом. Совместимость с разбавителем и растворимость сорбатов приравнивали 1, если они хорошо смешиваются или

Таблица 7.3. Оценка веса параметров методом парных сравнений i -м экспертом

Параметры	Параметры					Сумма N_i
	Вязкость	УФ*	Токсичность	Стоимость	Т кип.	
Вязкость		0	1	1	0	2
УФ	1		0	1	1	2
Токсичность	0	1		0	0	1
Стоимость	0	0	1		1	2
Т кип.	1	1	1	0		3
Общая сумма ΣN_i						10

* Прозрачность в УФ свете

Таблица 7.4. Базовая таблица экспертной оценки \bar{a}_i методом парных сравнений

Эксперт	Параметры					Сумма a_i
	Вязкость	УФ*	Токсичность	Стоимость	Т кип.	
1	0.20	0.20	0.10	0.20	0.30	1.0
2	0.25	0.15	0.15	0.25	0.20	1.0
3	0.20	0.30	0.20	0.10	0.15	1.0
4	0.25	0.15	0.25	0.15	0.20	1.0
\bar{a}_i	0.23	0.20	0.18	0.18	0.21	1.0

*Прозрачность в УФ свете

растворяются; 0.5 – если они частично смешиваются или ограниченно растворяются; 0 – если не смешиваются и не растворяются. Требования к вязкости для разбавителей в НФХ взяли жестче, чем для модификаторов, так как последние добавляются в небольших количествах, аналогичны требованию к токсичности. Весовые коэффициенты определены 5 экспертами методом парных сравнений.

Поскольку в многопараметрической оптимизации, называемой также векторной, одни критерии максимизируются, другие, наоборот, минимизируются, следует учитывать эти векторы. Перед частными критериями, которые максимизируются, в уравнении (7.1)

Таблица 7.5. Пример установки граничных условий, норм и весовых коэффициентов оптимизируемых параметров растворителей

Параметр	Граничные условия			Норма	Весовой коэффициент a_i
	разбавитель НФХ	модификаторы			
		НФХ	ОФХ		
Температура кипения, °С	≥60	≥60	≥60	70	0.11
Плотность, г/см ³	>0.6	>0.6	>0.6	0.9	0.09
Вязкость, 0.001 Па·с	≤0.8	≤1.9	≤1.5	0.5	0.12
Прозрачность в УФ, нм	<254	<254	<254	200	0.18
Стоимость, у.е./кг	<30	<40	<40	30	0.05
ПДК, мг/м ³	≥100	≥5	≥5	100	0.03
Смешиваемость с разбавителем	-	1	1	1	0.18
Растворимость сорбатов	≥0.5	≥0.5	≥0.5	1	0.14
Элюирующая сила, R^0	≤0.02	>0.02	≤0.40	0.30	0.10

ставится знак “плюс”, а перед минимизируемыми критериями – “минус”. Так, вязкость желательна как можно меньшая, следовательно, критерий вязкости берется со знаком “минус”. Чем больше положительная величина обобщенного критерия, тем лучше растворитель подходит для выбранного варианта ВЭЖХ. Параметры оптимизации, приведенные в табл. 7.5, пригодны, в первую очередь, для ВЭЖХ цветообразующих компонентов, кроме того, за время, прошедшее после публикации [324], выросли цены на растворители для ВЭЖХ. В связи с тем, что методы синтеза и очистки базовых растворителей за последние 40-50 лет изменились мало, важной является не абсолютная, а относительная стоимость растворителя. Поэтому Бидлингмейер в работе [59] рекомендует рассматривать стоимость растворителей, отнесенной к стоимости метанола.

В подборе наилучшего ассортимента растворителей для хроматографической лаборатории первостепенное значение имеет даже не обобщенный критерий, а граничные условия. Попробуем выбрать оптимальный разбавитель для НФХ на микроколоночном хроматографе “Миличром” с УФ-детектором. Если базу данных по физическим и эксплуатационным свойствам растворителей, приведенную в гл. 5, разместить в книге Excel и задать опцией *автофильтр* только одно граничное условие – предел прозрачности <225 нм, из 90 растворителей открытыми останется 36. Для выбранного хроматографа весьма значима низкая вязкость элюента. Задав второе граничное условие – вязкость <0.9, сократим число растворителей до 18. Задав температуру кипения $\geq 60^\circ\text{C}$, получим список из 8 растворителей. И только 4 растворителя с низкой элюирующей силой $R^*\leq 0.02$ будут отвечать требованиям граничных условий: гексан, гептан, изооктан и циклогексан. Если найти обобщенный критерий по трем параметрам: вязкости, прозрачности в УФ свете и стоимости – максимальный обобщенный критерий имеет гексан, вплотную за ним следует гептан, затем изооктан и циклогексан. Этот порядок соблюдается при широкой вариации весовых коэффициентов. Такая же последовательность соблюдается, если заменить порог прозрачности в УФ свете показателем преломления. Если учесть еще пожароопасные свойства (температуру вспышки и самовозгорания), ПДК, температуру кипения, и плотность, задав им

сравнительно небольшие веса ($a_i=0.01-0.03$), обобщенный критерий по 8 показателям отдает небольшое преимущество гептану по сравнению с гексаном. Таким образом, многопараметрическая оптимизационная процедура на количественно формализованном уровне показала, что для разработки рутинных методик анализа в условиях НФХ с использованием микроколоночного хроматографа со шприцевым насосом среднего давления предпочтение следует отдавать таким разбавителям, как гексан и гептан.

Найдем по описанному алгоритму список модификаторов для НФХ, обладающих хорошими технико-эксплуатационными характеристиками (табл. 7.6).

Если хлороформу присвоить максимальные численные значения температуры вспышки и самовоспламенения (он, как известно, не горюч) и найти обобщенные критерии при заданных коэффициентах веса и нормирующих значениях параметров, из 7 растворителей в тройку лучших растворителей попадает этанол, пропан-2-ол и ТГФ. Затем следует хлороформ и диизопропиловый эфир. Если исключить из списка этанол, мы получаем традиционный рейтинг модификаторов НФХ. Почему этанол, обладая низкой токсичностью, высокой химической стабильностью и превосходными хроматографическими характеристиками, нашел ограниченное применение? Это связано в первую очередь с человеческим фактором. Во

Таблица 7.6. Рейтинг модификаторов для НФХ

Растворитель	$T_{\text{кип}}$	ρ , г/см ³	n_D^{25}	$\eta \cdot 10^3$, Па·с	λ^* , нм	Стоим. у.е./кг	ПДК, мг/м ³	T всп.	T свп.	K_S
Изопропиловый эфир	68.3	0.718	1.3655	0.379	220	21.2	250	-28	443	0.3
1,4-диоксан	101.3	1.027	1.4203	1.194	225	46.7	10	5	300	-0.8
1,2-дихлорэтан	83.5	1.246	1.4421	0.779	230	46.3	10	13	413	-0.7
Пропан-2-ол	82.4	0.781	1.3752	2.073	205	24.6	980	11.7	400	2.5
ТГФ	66.0	0.884	1.4036	0.460	212	51.1	100	-20	250	-0.4
Хлороформ	61.2	1.480	1.4429	0.540	245	30.6	20	-	-	1.4
Этанол	78.3	0.785	1.3594	1.078	205	25.7	1000	18	392	2.8
Норма	70	0.900	1.333	1.000	220	40.0	20	10	300	
Граничные условия	≥ 60	>0.70	-	<2.10	<254	<55	≥ 10	-	-	
\bar{a}_i	0.04	0.01	-	0.25	0.35	0.25	0.07	0.02	0.01	

многих странах его стоимость искусственно завышена, существует строгое правительственное регулирование его использования и распределения, в лабораториях предусмотрена многоуровневая отчетность. Следовательно, этанол получил гораздо меньше внимания, чем заслуживает, если бы рассматривались только его хроматографические свойства. Что касается денатурированного этанола, то он содержит кетоны, этилацетат, метанол или пропан-2-ол, абсолютированный этанол часто содержит бензол. Все это затрудняет работу в жидкостной хроматографии с денатурированным или абсолютированным коммерческим спиртом в плане воспроизводимости параметров удерживания и из-за высокого поглощения в УФ свете денатурирующих примесей. Среди изготовителей не стандартизирован уровень и состав этих примесей. Та же последовательность в рейтинге модификаторов для НФХ практически сохраняется, если оценить их с точки зрения детектирования с помощью рефрактометра: этанол, пропан-2-ол, хлороформ, диизопропиловый эфир, ТГФ, 1,2-дихлорэтан, диоксан. Однако такой же рейтинг, как у хлороформа, имел бы этилацетат, превосходный модификатор для НФХ, если бы мы немного изменили граничное условие – порог прозрачности не <254 , а ≤ 254 нм. Если немного приподнять уровень граничных условий по УФ поглощению, этилацетат займет 4-ю позицию среди лучших для НФХ растворителей.

Оценим хроматографические свойства модификаторов для ОФХ. Понижим уровень требований к ПДК до 5 мг/м^3 , в связи с тем, что практически все они высокотоксичные растворители. С другой стороны, ужесточим требования к вязкости, так как концентрации модификатора в этом режиме хроматографии могут варьироваться от 0 до 100%. Опцией автофильтр выделим из 90 растворителей только 6, отвечающих заданным в табл. 7.7. граничным условиям и найдем обобщенные критерии. Этанол, как мы видим, опять занимает лидирующие позиции. За ним с одинаковым рейтингом следуют ацетонитрил и метанол, 4-е место у ТГФ. Кроме приведенных выше проблем применения этанола, этот растворитель в реальной практике ОФХ используется редко еще и потому, что его смеси с водой имеют слишком высокую вязкость. Такое же явление характерно для диоксана, ТГФ и метанола. В этом плане отличные свойства

имеет ацетонитрил, его смеси с водой не дают резкого увеличения вязкости. ТГФ и диоксан требуют дополнительного внимания и трудозатрат из-за склонности к образованию пероксидов.

Уксусную кислоту в ОФХ применяют для создания определенного рН в индивидуальном виде, а чаще в аммонийацетатных буферных растворах для улучшения формы пиков ионизирующихся слабокислых аналитов, в качестве основного модификатора ее не используют.

Для ОФХ с рефрактометрическим детектированием расчеты обобщенных критериев дают идентичный рейтинг модификаторов.

Таким образом, хеометрический анализ базы данных растворителей показывает, что в стандартном ассортименте типовой лаборатории, применяющей метод ВЭЖХ для аналитических целей, должны быть следующие растворители: *ацетонитрил, вода, гексан, гептан, 1,2-дихлорэтан, диоксан, метанол, пропан-2-ол, тетрагидрофуран, уксусная кислота, хлороформ, этилацетат, этанол*. Естественно, с учетом растворимости аналитов, способов детектирова-

Таблица 7.7. Рейтинг модификаторов для ОФХ

Растворитель	$T_{\text{кип}}$	ρ , г/см ³	n_D^{25}	$\eta \cdot 10^3$, Па·с	λ^* , нм	Стоим. у.е./кг	ПДК, мг/м ³	T всп.	T свп.	K_S
Ацетонитрил	81.6	0.777	1.3416	0.341	195	39.8	10	6	450	-0.5
Метанол	64.5	0.787	1.3265	0.544	205	21.6	5	11	464	-0.5
ТГФ	66	0.884	1.4036	0.46	212	51.1	100	-20	250	0.0
1,4-диоксан	101.3	1.027	1.4203	1.194	225	46.7	10	5	300	-0.8
Уксусная кислота	117.9	1.044	1.3698	1.124	230	37.6	5	42	428	-0.7
Этанол	78.3	0.78	1.3594	1.078	205	25.7	1000	18	392	6.3
Норма	70	0.900	1.333	1.000	210	40.0	10	10	300	
Граничные условия	≥ 60	>0.70	-	<1.20	<254	<55.0	≥ 5	-	-	
$\overline{a_i}$	0.04	0.01	-	0.3	0.3	0.25	0.07	0.02	0.01	

*Порог прозрачности в УФ свете.

ния и метода ВЭЖХ, а так же в соответствии с имеющимися ГОСТ на методику выполнения измерений, в этот комплект могут входить и другие растворители. Для получения методики ВЭЖХ с наилучшими эксплуатационными характеристиками целесообразно именно этим растворителям отдавать предпочтение, если они обеспечивают необходимый уровень чувствительности и разрешения.

На наглядных примерах мы показали, что применение обобщенных критериев позволяет легко и быстро в оболочке доступного программного обеспечения проводить выборку растворителей из базы данных и количественно сопоставлять технические достоинства растворителей при заданных нормирующих значениях параметров и весовых коэффициентах.

7.5. Обобщенные критерии элюирующей силы растворителей

В 5-й главе мы уже рассматривали кватернарные (4-х параметрические) обобщенные критерии полярности P^o и P_N , в которых весовые коэффициенты парциальных полярностей приняты одинаковыми. Однако все 4 параметра измерены или определены только для половины известных хроматографических растворителей, что сужает область применения этих критериев. Кроме того, допущение, что веса диэлектрической постоянной, параметра полярности P^o , растворимости Гильдебранда δ_r и сольватохромного параметра $E_T(30)$ в суммарной полярности одинаковы, можно принять только в качестве первого приближения.

Посмотрим, какую дополнительную информацию можно получить о полярных свойствах растворителей, оперируя обобщенными критериями. Возможности обобщения по уравнению 7.1 разных критериев полярности проанализированы в работе [425], обсуждены бинарные, тернарные и кватернарные обобщенные критерии K_s .

Кватернарные критерии P^o и P_N оценивали по их корреляциям с элюирующей способностью на силикагеле, оксиде алюминия, и на обращенно-фазовых сорбентах. Более высокая степень аппроксимации в корреляциях между обобщенным критерием и элюирующей силой, чем между любым исходным критерием и элюирующей силой, служила подтверждением, что они адекватней учитывают

суммарную полярность хроматографического растворителя. Используем шкалы $\epsilon^o(\text{Al}_2\text{O}_3)$, $\epsilon^o(\text{SiO}_2)$, S и $\epsilon^o(\text{C}_{18})$ в качестве стандартных при калибровке весовых коэффициентов и для определения лучшего набора парциальных полярностей в обобщенных критериях. Корреляции оптимального обобщенного критерия полярности, включающего m показателей с заданными коэффициентами веса, с экспериментально определенными элюотропными рядами $\epsilon^o(\text{Al}_2\text{O}_3)$, $\epsilon^o(\text{SiO}_2)$, S или $\epsilon^o(\text{C}_{18})$ должны иметь максимально высокую степень аппроксимации R^2 . Достоинством такого оптимизированного обобщенного критерия является то, что он максимально подогнан к конкретному варианту хроматографии, хотя при этом теряется универсальность, присущая первым приближениям и упрощенным моделям (P^o и P_N).

Назначим $\epsilon^o(\text{Al}_2\text{O}_3)$ независимой переменной и определим тесноту линейных корреляций (7.5), варьируя в уравнении (7.1) число m от 1 до 4 и меняя величину весовых коэффициентов a_i в диапазоне от 0 до 1 таким образом, чтобы их сумма была равна 1. Чем выше степень аппроксимации R^2 для корреляции (7.5), тем лучше критерий полярности характеризует хроматографическую активность растворителя на данном сорбенте.

$$K_s = K_1 \epsilon^o(\text{Al}_2\text{O}_3) + K_2, \quad (7.5)$$

где K_s – обобщенный критерий полярности. В качестве нормирующего значения x_i^n для всех вариантов примем параметр, измеренный для воды, в результате чего величины всех P_i участвующих в сравнительном анализе, примут значения в диапазоне $P_i=0-1$, что представляется удобным при сопоставлении получающихся элюотропных рядов. Как видно из табл. 7.8, из 4-х исходных параметров наилучшую корреляцию с $\epsilon^o(\text{Al}_2\text{O}_3)$ демонстрирует параметр δ_r , наихудшую – ϵ_r . Обобщение любых 2-х параметров приводит к улучшению степени аппроксимации.

Чтобы найти оптимальные весовые коэффициенты a_i для бинарных критериев, определим при нескольких значениях a_i величину R^2 для соотношения (7.5) и установим максимум функции $R^2=f(a_i)$. На рис. 7.1 приведен пример корреляции бинарного K_s , а на рис. 7.2 вид функции $R^2=f(a_i)$, по которому нашли оптимальное соотношение a_i . Наиболее тесную корреляцию (7.5) дает бинарный критерий, скомбини-

рованный из δ_r и P' (рис. 7.1). Включение в обобщенный критерий трех параметров позволяет дополнительно улучшить достоверность статистической зависимости (7.1), довести значение R^2 до 0.9176.

Для поиска оптимального соотношения весовых коэффициентов в тернарном критерии K_s применим одновариантную оптимизацию. Найдем максимум функции $R^2=f(a_i)$, изменяя a_i от 0 до 1, присваивая двум другим параметрам одинаковые значения $(1-a_i)/2$. Например, если $a_1=0.5$, тогда $a_2=0.25$, $a_3=0.25$. Затем эту процедуру повторим для двух других весовых коэффициентов. Получим 3 функции $R^2=f(a_i)$, аналогичные приведенной на рис. 7.2. На треугольной диаграмме (рис. 7.3) черными точками отмечены максимумы указанных функций, ограничивающих область, в которой следует ожидать оптимальных значений a_i . Поочередно присваивая одному из коэффициентов a_i наилучшие значения, найденные при одновариантной оптимизации, и варьируя другие, найдем величины a_i при которых корреляция тернарного K_s и $\varepsilon^o(\text{Al}_2\text{O}_3)$ наиболее тесна. Белыми точками на рис. 7.3 отмечены соотношения a_i при которых R^2 максимальна и равна 0.9176.

Поиск оптимального решения для кватернарного критерия полярности показал, что учет диэлектрической проницаемости не приводит к дополнительному улучшению степени аппроксимации. В оптимизированном кватернарном K_s весовой коэффициент для диэлектрической составляющей равен всего 0.002. Этой величиной

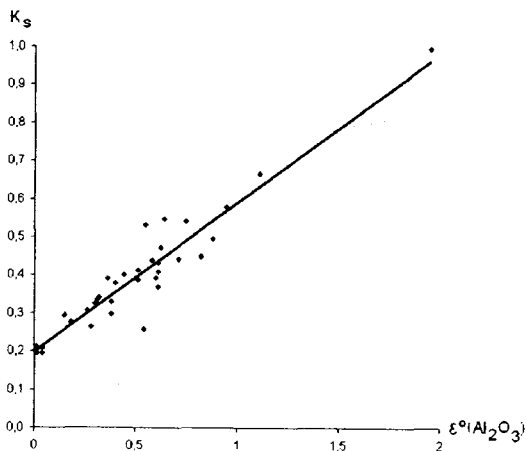


Рис. 7.1. Корреляция (7.5) для бинарного обобщенного критерия K_s на основе параметров δ_r и P' с оптимизированными значениями a_i

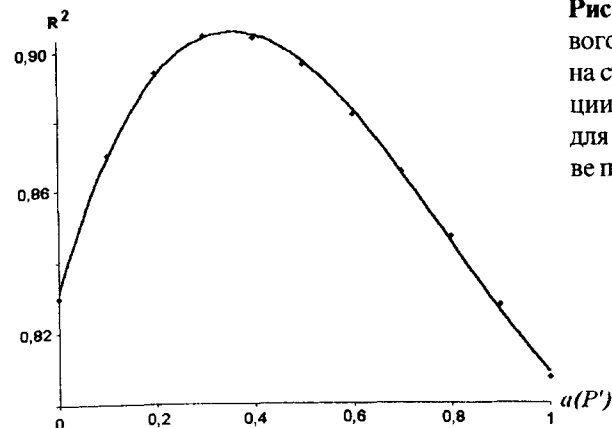


Рис. 7.2. Влияние весового коэффициента $a(P')$ на степень аппроксимации R^2 корреляции (7.5) для критерия K_s на основе параметров δ_r и P'

можно пренебречь. Таким образом, для оценки полярности растворителей для НФХ на оксиде алюминия достаточно применения тернарного критерия полярности (см. табл. 7.9.).

По описанному выше алгоритму проанализируем корреляции (7.6).

$$K_s = K_1 \varepsilon^o(\text{SiO}_2) + K_2 \quad (7.6)$$

Лучше всех исходных критериев с элюирующей силой $\varepsilon^o(\text{SiO}_2)$ коррелирует параметр полярности P' . Оптимальное число частных критериев, входящих в обобщенный K_s , равно 3. Как и в случае с Al_2O_3 , диэлектрической постоянной можно пренебречь. Между вариантами обобщенных критериев полярности, прокалиброванных с помощью элюирующей способности растворителей на Al_2O_3 и SiO_2 , найдены заметные различия. Оптимизированный весовой коэффициент нормализованного параметра $E_r(30)$ для силикагеля более чем в 2 раза меньше, чем для оксида алюминия, а весовой коэффициент параметра P' , наоборот, почти в 2 раза больше (табл. 7.8). Величины обобщенных критериев полярности на оксиде алюминия и силикагеле не одинаковы по абсолютной величине, элюотропные ряды на их основе не идентичны, некоторые растворители проявляют относительно большую элюирующую способность на одном сорбенте и меньшую – на другом.

Как практически использовать результаты проведенных хеометрических расчетов? Во-первых, зная значения трех параметров растворителя δ_r , $E_r(30)$ и P' , по корреляциям (7.5) и (7.6), можно найти

Таблица 7.8. Коэффициенты* уравнений (7.5) и (7.6) для критериев K_s с различным числом обобщаемых параметров и оптимизированными весовыми коэффициентами a_i : 1 – неподвижная фаза Al_2O_3 ; 2 – SiO_2

Сорбент	Параметры, включенные в K_s	Весовые коэффициенты a_i				Коэффициенты ур. (7.8)		R^2
		ε_r	δ_T	$E_T(30)$	P'	K_1	K_2	
1	ε_r	1	0	0	0	0.477	-0.061	0.717
2	ε_r	1	0	0	0	0.619	-0.066	0.709
1	δ_T	0	1	0	0	0.322	0.255	0.830
2	δ_T	0	1	0	0	0.412	0.254	0.795
1	$E_T(30)$	0	0	1	0	0.317	0.480	0.830
2	$E_T(30)$	0	0	1	0	0.397	0.482	0.737
1	P'	1	0	0	0	0.538	0.076	0.807
2	P'	1	0	0	0	0.720	0.062	0.847
1	$\delta_T, E_T(30)$	0	0.49	0.51	0	0.319	0.372	0.881
2	$\delta_T, E_T(30)$	0	0.5	0.5	0	0.404	0.368	0.827
1	δ_T, P'	0	0.67	0	0.33	0.394	0.196	0.903
2	δ_T, P'	0	0.57	0	0.43	0.544	0.172	0.907
1	$E_T(30), P'$	0	0	0.64	0.36	0.398	0.335	0.890
2	$E_T(30), P'$	0	0	0.48	0.52	0.565	0.264	0.882
1	ε_r, P'	0.36	0	0	0.64	0.516	0.026	0.850
1	$\varepsilon_r, E_T(30)$	0.20	0	0.80	0	0.349	0.372	0.850
1	$\delta_T, E_T(30), P'$	0	0.40	0.35	0.25	0.374	0.291	0.918
2	$\delta_T, E_T(30), P'$	0	0.45	0.15	0.40	0.530	0.214	0.909
1	$\varepsilon_r, \delta_T, E_T(30), P'$	0.25	0.25	0.25	0.25	0.414	0.187	0.890
2	$\varepsilon_r, \delta_T, E_T(30), P'$	0.25	0.25	0.25	0.25	0.537	0.183	0.880
1	$\varepsilon_r, \delta_T, E_T(30), P'$	0.002	0.400	0.35	0.248	0.374	0.289	0.918
2	$\varepsilon_r, \delta_T, E_T(30), P'$	0.002	0.45	0.148	0.40	0.533	0.211	0.909

*Примечание. Жирным шрифтом выделены параметры уравнений (7.5) и (7.6), имеющие наибольшую достоверность.

ориентировочные значения $\varepsilon^o(Al_2O_3)$ и $\varepsilon^o(SiO_2)$, если они не известны из эксперимента. Если не хватает данных для составления тернарного критерия полярности, элюирующую силу растворителя можно спрогнозировать по любому бинарному критерию K_s с несколько меньшей, но достаточно большой достоверностью ($R^2=0.83-0.91$). Наконец, если не известен один из трех обобщаемых параметров, но известна элюирующая способность, имеется возможность из равен-

ства соотношений (7.1) и (7.5), или (7.6) оценить величину параметра. Например, рассчитаем δ_T для изоамилового спирта.

$$a_1(x_1/x_1^n) + a_2(x_2/x_2^n) + a_3(x_3/x_3^n) = K_1 \varepsilon^o + K_2 \quad (7.7)$$

Подставив в (7.7) численные значения параметров и коэффициентов, получим $0.40 \cdot (x_1/52.2) + 0.35 \cdot (205.0/264.0) + 0.25 \cdot (3.5/10.2) = 0.374 \cdot 0.61 + 0.291$, расчет даст $x_1 = 21.1 \text{ МПа}^{1/2}$.

Прогнозируемые значения элюирующей способности или частных критериев для ряда растворителей приведены в табл. 7.9. Применение корреляционных соотношений позволило вычислить K_s 60 растворителей для вариантов НФХ на силикагеле и оксиде алюминия (табл. 7.10).

Рассмотрим возможность градуировки обобщенного критерия с помощью элюирующей силы S для ОФХ (табл. 5.8). Повторим процедуру поиска оптимального обобщенного критерия полярности, взяв за основу корреляцию (7.8). Примем, что максимальная величина R^2 для (7.8) будет отвечать наилучшему набору K_s , определенному по (7.1). Следует учитывать, что элюирующая способность S обратно пропорциональна полярности растворителя. Для воды $S=0$.

$$K_s(S) = K_1 S + K_2, \quad (7.8)$$

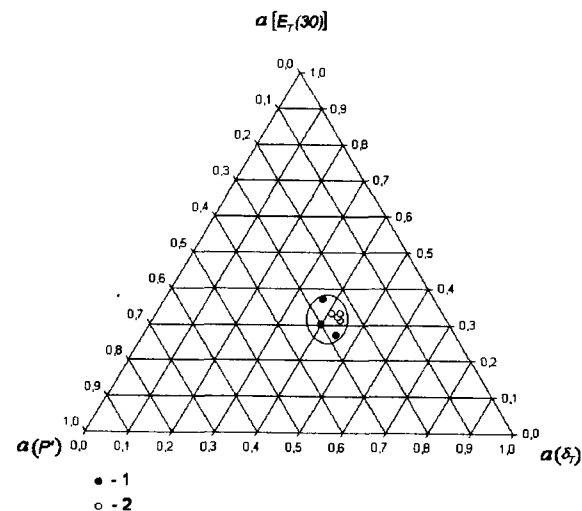


Рис. 7.3. Зона оптимальных соотношений весовых коэффициентов a_i для тернарного критерия полярности $K_s(Al_2O_3)$: 1 – значения, полученные при одновариантной оптимизации; 2 – значения в глобальном оптимуме

Таблица 7.9. Ориентировочные параметры полярности и элюирующей способности растворителей, рассчитанные по ур. (5.8), (7.5) и (7.6)

Растворители	δ_T , МПа ^{1/2}	P'	$\varepsilon^\circ(\text{SiO}_2)$	$\varepsilon^\circ(\text{Al}_2\text{O}_3)$	
Анизол	29.3		0.32	0.38	
Анилин			0.48		
Бензиловый спирт			0.72		
Бензонитрил			0.48	0.57	
Бромбензол			0.29	0.35	
Бромформ			0.26	0.34	
Бутан-1-ол			0.49	0.70	
Бутан-2-ол			4.5	0.52	
Изобутанол			4.6	0.52	
<i>n</i> -Бутилацетат			2.4	0.25	
Бутиронитрил			0.50	0.65	
2-Бутоксизтанол			6.0	0.57	0.74
Вода				1.95	
Гексан-1-ол			2.5	0.43	0.56
Глицерин				1.02	1.32
ДМФА				0.66	0.76
1,2-диметоксизтан				0.29	0.38
Диэтиламин				0.49	
Диэтиленгликоль				0.64	0.88
Диэтилсульфид				0.29	0.38
Изопентанол	21.1		0.47		
<i>мета</i> -Крезол			0.88	1.14	
<i>пара</i> -Ксилол			0.20		
Мезитилен			0.12	0.15	
Метилацетат			6.0	0.46	
Метилизобутилкетон			4.0	0.33	
2-Метоксизтанол				0.53	0.68
Муравьиная кислота				0.60	
Нитробензол				0.47	0.56
Октан-1-ол				0.41	0.57
Петролейный эфир			15.8	0.1	
2-Пиколин	22.2		0.43		
Пропионовая кислота			0.60	0.78	
1,1,2,2-тетрахлорэтан			0.32	0.42	
1,2,4-трихлорбензол			0.22	0.28	

продолжение таблицы 7.9.

Растворители	δ_T , МПа ^{1/2}	P'	$\varepsilon^\circ(\text{SiO}_2)$	$\varepsilon^\circ(\text{Al}_2\text{O}_3)$
1,2,2-трифтор-1,1,2-трихлорэтан		2.4	0.02	0.02
2,2,2-трифторэтанол			0.99	1.29
Трихлорэтилен			0.23	0.30
Хлористый амил			0.20	
Хлористый бутил			0.20	
Хлористый изопропил			0.22	
Хлористый пропил		2.7		
Циклогексанон			0.44	0.50
Циклопентан			0.04	

Расчеты показали, что самая высокая степень аппроксимации ($R^2=0.9286$) характерна для бинарного $K'_s(S)$, полученного при обобщении сольватохромного параметра $E_s(30)$ и параметра P' :

$$K'_s(S) = 0.978 - 0.1115S \quad (7.9)$$

Ни тернарные, ни кватернарные критерии K_s не дали лучшего приближения, следовательно, в соответствии с принципом “лезвия Оккама” целесообразно ограничиться полученным бинарным критерием. В табл. 7.10 приведены рассчитанные по (7.9) значения этого критерия для растворителей, которые частично или хорошо растворимы в воде, ацетонитриле, метаноле или ТГФ и могут использоваться, если не как основные, то как малообъемные модификаторы обращенной ПФ. Сопоставление величин $K'_s(S)$ с $K'_s(\text{SiO}_2)$ показывает, что эти эдзотропные ряды совпадают полностью, т.е. растворители увеличивают свою полярность в обоих рядах в одинаковой последовательности, различие заключается только в численных значениях критерия полярности. Между $K'_s(S)$ и $K'_s(\text{SiO}_2)$ есть четкая зависимость, которая наиболее достоверно описывается логарифмическим уравнением ($R^2=0.9869$):

$$K'_s(S) = 0.576 \ln[K'_s(\text{SiO}_2)] + 0.981 \quad (7.10)$$

Вместе с тем, процедура оптимизации обращенно-фазового обобщенного критерия полярности по значениям $\varepsilon^\circ(\text{C}_{18})$, приведенным в табл. 5.8., дала следующий результат.

Таблица 7.10. Оптимизированные шкалы полярности растворителей для варианта НФХ

Растворитель	$K_S(\text{SiO}_2)$	$K_S(\text{Al}_2\text{O}_3)$	Растворитель	$K_S(\text{SiO}_2)$	$K_S(\text{Al}_2\text{O}_3)$
Декан	0.20	0.29	Изопентанол	0.44	0.52
Изооктан	0.21	0.29	Циклогексанон	0.45	0.49
Пентан	0.21	0.29	<i>трет</i> -Бутанол	0.45	0.51
Циклогексан	0.21	0.29	1,4-Диоксан	0.46	0.48
Гексан	0.21	0.30	2-Бутанон	0.46	0.50
Гептан	0.22	0.30	2-Пиколин	0.47	0.50
Триэтиламин	0.28	0.34	Нитробензол	0.47	0.50
тетрахлорметан	0.29	0.35	Бензонитрил	0.47	0.51
Сероуглерод	0.29	0.36	Изобутиловый спирт	0.47	0.54
Изопропиловый эфир	0.30	0.36	Бутан-1-ол	0.47	0.55
<i>пара</i> -Ксилол	0.33	0.38	Ацетон	0.48	0.52
Диэтиловый эфир	0.33	0.38	Бутан-2-ол	0.48	0.54
Бутилацетат	0.33	0.40	Пропан-2-ол	0.48	0.56
Хлористый пропилен	0.34	0.40	Метилацетат	0.49	0.51
Толуол	0.34	0.40	Пиридин	0.49	0.52
Трихлорэтилен	0.34	0.40	Пропан-1-ол	0.49	0.57
Бензол	0.36	0.41	2-Метоксиэтанол	0.50	0.56
Хлорбензол	0.36	0.42	2-Бутоксиэтанол	0.51	0.57
Бромэтан	0.37	0.42	Анилин	0.53	0.56
Бромбензол	0.37	0.42	Этанол	0.53	0.61
Анизол	0.38	0.43	Уксусная кислота	0.54	0.59
Метилизобутилкетон	0.40	0.45	Диэтиленгликоль	0.55	0.63
Гексан-1-ол	0.40	0.50	ДМФА	0.56	0.58
Хлористый метилен	0.41	0.47	Ацетонитрил	0.57	0.60
Тетрагидрофуран	0.42	0.47	Нитрометан	0.58	0.61
Хлороформ	0.43	0.47	Диметилсульфоксид	0.58	0.61
Пентан-1-ол	0.43	0.51	Метанол	0.61	0.68
Октан-1-ол	0.43	0.51	Этиленгликоль	0.70	0.75
Этилацетат	0.43	0.47	Формамид	0.73	0.77
1,2-Дихлорэтан	0.43	0.49	Вода	1.00	1.00

$$K_S(C_{18}) = 0.590 - 0.015 \epsilon^\circ(C_{18}), \quad (7.11)$$

$R^2=0.8556$. Максимальная аппроксимация достигнута при обобщении 4-х параметров: весовой коэффициент в кватернарном критерии $K_S(C_{18})$ для ϵ_r составляет 0.06, для δ_r $a_i=0.77$, для $E_T(30)$ $a_i=0.03$, а для P' величина $a_i=0.14$.

О том, что диэлектрическая постоянная правомерно включена в список обобщаемых параметров полярности, свидетельствует и другой пример. В табл. 7.11. приведен элюотропный ряд для адсорбционной хроматографии на активированном угле. Наиболее значимую корреляцию из 4-х параметров полярности с элюирующей силой $\epsilon^\circ(C)$ проявляет именно диэлектрическая проницаемость ϵ_r . Попытка найти наилучший обобщенный параметр приводит к выражению

$$K_S(C) = 0.92 - 3.71 \epsilon^\circ(C), \quad (7.12)$$

$R^2=0.702$, $n=11$. Коэффициент a_i для ϵ_r составляет 0.70, для $E_T(30)$ $a_i=0.30$ параметрами δ_r и P' можно пренебречь. В качестве нормирующих значений взяли параметры метанола. Из корреляций резко выпадают неожиданно низкие точки для гексана и гептана. Если их отбросить как недостоверные, а вместо них включить данные по ϵ_r и $E_T(30)$ для n -октана и n -нонана, получаем

$$K_S(C) = 1.0 - 4.0 \epsilon^\circ(C), \quad (7.13)$$

$R^2=0.84$, $n=11$.

Превалирование веса того или иного показателя полярности в обобщенном критерии, откалиброванном по элюирующей силе растворителя на конкретном типе сорбента, дает дополнительную информацию при анализе механизмов хроматографических процессов на данном типе сорбента.

Таблица 7.11. Элюотропный ряд растворителей для адсорбционной хроматографии на активированном угле [63]

Растворитель	$\epsilon^\circ(C)$	Растворитель	$\epsilon^\circ(C)$
Метанол	0.00	Бутилхлорид	0.13
Ацетонитрил	0.04	<i>n</i> -Октан	0.14
Этанол	0.05	ТГФ	0.14
<i>n</i> -Гексан	0.10	<i>n</i> -Нонан	0.17
Этилацетат	0.13	Хлороформ	0.18
<i>n</i> -Гептан	0.13	Бензол	0.20
Метиленхлорид	0.13	Ксилол	0.24

Таблица 7.12. Шкалы полярности растворителей, адаптированные к неполярным сорбентам

Растворитель	$K_3(S)$	$K_3(C_{18})$	$K_3(C)$	Растворитель	$K_3(S)$	$K_3(C_{18})$	$K_3(C)$
Гексан			0.21	Бутан-1-ол	0.54		
Гептан			0.21	Ацетон	0.55	0.42	
<i>пара</i> -Ксилол			0.23	Бутан-2-ол	0.56		
Диэтиловый эфир	0.35			Пропан-2-ол	0.57	0.46	
Бутилацетат	0.37			Нитробензол			
Бензол			0.23	Метилацетат	0.57		
Метилизо- бутилкетон	0.44			Пиридин	0.58		
Гексан-1-ол	0.45			Пропан-1-ол	0.58	0.46	
Метилхлорид	0.47		0.41	2-Метоксиэтанол	0.61		
Тетрагидрофуран	0.48	0.55	0.36	2-Бутоксиэтанол	0.63		
Хлороформ			0.31	Анилин	0.63		
Амиловый спирт	0.49			Этанол	0.64	0.51	0.81
Октан-1-ол	0.49			Уксусная кислота	0.64		
Этилацетат	0.50		0.34	Диэтиленгликоль	0.65		
Изопентанол	0.51			ДМФА	0.65	0.49	
Циклогексанон	0.51			Ацетонитрил	0.65	0.52	1.02
<i>трет</i> -Бутанол	0.52			Нитрометан	0.66		
1,4-Диоксан	0.52	0.40		ДМСО	0.66		
2-Бутанон	0.52			Метанол	0.68	0.60	1.00
2-Пиколин	0.52			Этиленгликоль	0.76		
Бензонитрил	0.53			Формамид	0.79		
Изобутанол	0.54			Вода	1.00	1.00	

Подвижные фазы из индивидуальных растворителей встречаются в практике редко. Обычно используют бинарные или многокомпонентные подвижные фазы, которые включают наряду с разбавителем один или несколько модификаторов. В работах [99,100,135,250] проанализированы экспериментальные зависимости параметров удерживания соединений фенольного типа и ряда полифункциональных органических соединений от их строения и общей полярности бинарных подвижных фаз в условиях НФХ и ОФХ. В качестве шкалы полярности, как говорилось выше, в них использовали обобщенные критерии P^o и P_N . Эти критерии хорошо

коррелируют с оптимизированными бинарными и тернарными обобщенными критериями, рассмотренными выше.

$$P^o = 1.419K_3(S) - 0.463, \quad (7.14)$$

$$R^2 = 0.9639$$

$$P^o = 1.275K_3(SiO_2) - 0.287, \quad (7.15)$$

$$R^2 = 0.9669$$

$$P_N = 145.96K_3(S) - 46.72, \quad (7.16)$$

$$R^2 = 0.9367$$

$$P_N = 134.33K_3(SiO_2) - 30.72, \quad (7.17)$$

$$R^2 = 0.9669.$$

Следовательно, все качественные выводы и обоснования целесообразности применения обобщенных критериев полярности в НФХ и ОФХ, приведенные в [242,243,324], справедливы не только для критериев первого приближения P^o и P_N , но и для критериев с уточненными весовыми коэффициентами обобщаемых параметров. В итоге получены специализированные шкалы полярности для наиболее важных вариантов жидкостной хроматографии. Оптимизация позволила статистически обоснованно исключить из K_3 один или два частных критерия, выявить особенности проявления полярных свойств растворителей на разных неподвижных фазах, которые еще ждут своей физико-химической трактовки.

7.6. Оценка оптимальности состава бинарной подвижной фазы по обобщенным целевым функциям

Возможной реализацией многопараметрической оптимизации хроматографических методик является обобщенная целевая функция [418]. Обобщенная целевая функция использована при оптимизации технико-эксплуатационных свойств бинарных ПФ при разработке методик анализа с применением ВЭЖХ [367,390]. Ее записывают следующим образом:

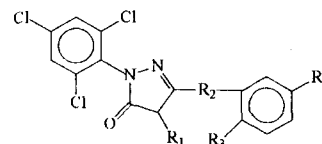
$$F_{об} = \sum_{k=1}^s a_k \frac{F_k}{F_k^{норм}} \rightarrow \max, \quad (7.18)$$

где $F_{об}$ – значения обобщенной целевой функции для s -той подвижной фазы, a_k – статистически обоснованный весовой коэффициент k -той целевой функции F_k , $F_k^{норм}$ – нормирующее значение для F_k , s –

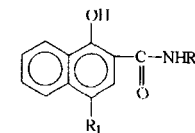
число составляющих (частных) целевых функций. При этом перед составляющими целевыми функциями, которые максимизируются, ставится знак “плюс”, перед минимизируемыми – знак “минус”. Значения $F_k^{норм}$ принимается при максимализации k -той целевой функции $F_k^{норм} = F_k^{max}$, при ее минимизации – $F_k^{норм} = F_k^{min}$. Например, если оптимизируется оптическая плотность подвижной фазы, величина $F_k^{норм}$ равна минимальному значению функции оптической плотности от концентрации модификатора.

Для поиска оптимального решения по обобщенной целевой функции (7.18) применим табличный процессор Excel, входящий в пакет программ Microsoft Office. Алгоритм ввода данных в электронную таблицу и расчета обобщенной целевой функции детализирован в [367,418]. В табл. 7.13 приведен лист рабочей книги Excel с базой данных по зависимостям хроматографических свойств бинарных ПФ от объемной доли модификаторов. В ячейки заносят функции “свойство – объемная доля модификатора”, рассмотренные в предыдущих разделах. Поскольку по умолчанию начальное значение объемной доли модификатора $\phi_2=0$, в ячейках отображаются значения параметра разбавителя. В табл. 7.14 представлен вид листа в цифровом формате, в котором задаются параметры и выполняется поиска оптимального решения. Для автоматизации расчетов используют макросы и встроенную в электронную таблицу специальную программу “Поиск решения” (Solver). “Поиск решения” не устанавливается по умолчанию, его надо дополнительно установить с дистрибутива. Это приложение применяют для поиска оптимального решения некоторой задачи в случае, если имеется несколько входных значений, а также набор ограничений на решение.

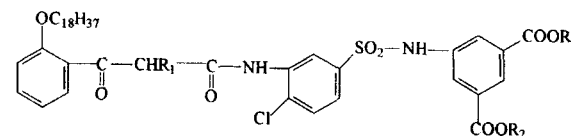
Рассмотрим в качестве примера подбор оптимальных условий микроколоночной ВЭЖХ гидрофобных цветообразующих компонентов фотоматериалов. Эти соединения мало растворимы в гексане, ацетонитриле и метаноле, нерастворимы в воде, хорошо растворимы в таких среднеполярных растворителях, как хлороформ, этилацетат, ТГФ, диоксан. Их растворимость в смесях гексана со спиртами лучше, чем в смешиваемых исходных растворителях. Хорошую растворимость аналита в ПФ (1-50 мас.% и выше) примем за 1, растворимость меньше 0.01 мас.% примем за ноль, малой растворимости (0.01-1 мас.%) присвоим величину 0.5.



Пурпурные компоненты



Голубые компоненты



Желтые компоненты

В качестве примесей цветообразующие компоненты содержат менее гидрофобные исходные вещества и изомерные соединения. Очевидно, что такие аналиты удобнее анализировать методом НФХ. Поместим в табл. 7.14 оптимизируемые параметры, граничные условия и весовые коэффициенты a_k уравнения (7.18). Граничные условия назовем с учетом применения микроколоночного хроматографа “Милихром”.

Таблица 7.13. Вид базы данных для бинарных ПФ в численном формате

Разбавитель	Модификатор	$T_{кпп}$	ρ	η	УФ	у.е./л	ПДК	$\varepsilon^\circ(S)$	Раст.
Гексан	Пропан-1-ол	68.8	0.66	0.30	195 33.9	300	0.01	0.5	
Гексан	Пропан-1-ол	68.8	0.66	0.30	195 33.9	300	0.01	0.5	
Гексан	Этилацетат	68.8	0.66	0.30	195 33.9	300	0.01	0.5	
Гексан	Диоксан	68.8	0.66	0.30	195 33.9	300	0.01	0.5	
Гексан	Хлороформ	68.8	0.66	0.30	195 33.9	300	0.01	0.5	
Гексан	Этанол	68.8	0.66	0.30	195 33.9	300	0.01	0.5	
Гексан	ТГФ	68.8	0.66	0.30	195 33.9	300	0.01	0.5	
Гексан	ДЭЭ	68.8	0.66	0.30	195 33.9	300	0.01	0.5	
Вода	Ацетонитрил	100	1.00	0.89	190 16.8	1200	0	0	
Вода	Метанол	100	1.00	0.89	190 16.8	1200	0	0	
Вода	ТГФ	100	1.00	0.89	190 16.8	1200	0	0	
Вектор оптимизации		max	max	min	min min	max	max	max	

Примечание: ПДК для воды отсутствует, условное значение 1200 необходимо для максимизации данной составляющей функции. Элюирующая сила воды для ОФХ $S=0$. Растворимость сорбата в ПФ: 1 – хорошо растворим; 0 – нерастворим; 0,5 – мало растворим. ДЭЭ – диэтиловый эфир.

Таблица 7.14. Пример поиска обобщенной целевой функции для микро-колоночной НФХ цветообразующих компонентов

Система	φ_2	T кип	ρ	η	УФ	у.е./л	ПДК	ε°	Раст.
Гексан-этилоцетат	0	68.8	0.655	0.30	195	33.9	300	0.01	0.5
	0.03	69.0	0.658	0.30	197	33.8	297	0.23	0.5
	0.08	69.5	0.664	0.31	200	33.6	292	0.30	0.5
	0.1	69.6	0.666	0.31	201	33.5	290	0.31	0.6
	0.15	70.0	0.672	0.32	204	33.3	285	0.33	0.6
	0.2	70.5	0.678	0.33	207	33.1	280	0.34	0.6
	0.3	71.3	0.690	0.34	213	32.7	270	0.36	0.7
	0.4	72.1	0.702	0.35	219	32.3	260	0.38	0.7
	0.5	73.0	0.715	0.36	225	31.9	250	0.40	0.8
	0.6	73.8	0.727	0.37	230	31.5	240	0.42	0.8
	0.7	74.6	0.740	0.39	236	31.1	230	0.44	0.9
	0.8	75.4	0.754	0.40	242	30.7	220	0.46	0.9
	0.9	76.3	0.767	0.41	248	30.3	210	0.48	1.0
	1	77.1	0.781	0.43	254	29.9	200	0.50	1.0
$F_k^{норм}$		77.1	0.781	0.30	195	29.9	300	0.50	1.0
Коэффициенты веса		0.15	0.05	0.2	0.1	0.05	0.05	0.2	0.2
Граничные условия	Min:	60	0.650	0.28	195	25	100	0.2	0.5
	Max:	100	1.400	0.8	230	55	1200	0.3	1
$F_{об}$		F_1	F_2	F_3	F_4	F_5	F_6	F_7	F_8
0.09		0.14	0.04	-0.21	-0.10	-0.06	0.05	0.12	0.11

Примечание: Жирным курсивом обозначены значения параметров, выходящих за допустимые границы.

Наиболее узким местом в НФХ гидрофобных цветообразующих оказался допустимый диапазон элюирующей силы. При ее увеличении резко падает селективность разделения. Очень осторожно следует относиться к установлению граничных условий. Возможны ситуации, когда заданные диапазоны не позволяют найти общее решение. Поэтому, пользуясь методом обобщенной целевой функции, есть смысл применять прием последовательного назначения граничных условий, следя за тем, что бы граничные условия для менее весомых факторов не экранировали оптимальный диапазон наиболее важных оптимизируемых параметров. При необходимости компромисса можно увеличить допустимый диапазон для менее принципиального свойства, пожертвовав, например, сто-

имостью растворителя, но сохранив жесткие требования по элюирующей силе и прозрачности в УФ-свете.

В табл.7.15. приведены формулы, используемые в табл. 7.13. и 7.14. для расчета целевых функций. Если неизвестна точная модель “свойство – состав элюента”, принимаем аддитивную модель. Если при расчете элюирующей силы в ОФХ используется обобщенный критерий полярности P_N , обращается вектор оптимизации этой составляющей функции.

Максимальное значение $F_{об}$, удовлетворяющее граничным условиям, не обязательно совпадает с действительным максимумом этой функции. Абсолютные значения $F_{об}$ зависят от числа составляющих целевых функций, от того, сколько из них максимизируется или минимизируется, от вариаций весовых коэффициентов, от принятых граничных условий и они представляют интерес, в первую очередь, при сопоставлении обобщенных целевых функций для нескольких подвижных фаз, рассматриваемых на предмет их оптимальности в конкретной аналитической задаче.

Таблица 7.15. Оптимизируемые параметры подвижной фазы для ВЭЖХ гидрофобных соединений фенольного типа

Параметр ПФ	Вид частной составляющей функции F_k
Предел прозрачности в УФ-свете, нм	$\lambda_{12}^* = \lambda_2 \varphi_2 + \lambda_1^* (1 - \varphi_2)$ или $\lambda_{12}^* = \{ \lambda_{12}^* + [\lambda_{12}^* (1 + A + B) - \lambda_{12}^*] \varphi_2 \} / (1 + A \varphi_2 + B \varphi_2^2)$
Плотность, г/см ³	$\rho_{12} = \rho_2 \varphi_2 + \rho_1 (1 - \varphi_2)$ или $\rho_{12} = \rho_1 + \beta \rho_1 \varphi_2 + (\rho_2 - \beta \rho_1 - \rho_1) \varphi_2^2$
Вязкость, сп	$\eta_{12} = \{ \eta_1 + [\eta_2 (1 + A + B) - \eta_1] \varphi_2 \} / (1 + A \varphi_2 + B \varphi_2^2)$
Температура кипения, °C	$T_{12} = \frac{T_1 + [T_2 (1 + A + B) - T_1] \varphi_2}{1 + A \varphi_2 + B \varphi_2^2}$ или $T_{12} = T_2 \varphi_2 + T_1 (1 - \varphi_2)$
Растворимость аналита	$L_{12} = L_2 \varphi_2 + L_1 (1 - \varphi_2)$ или $L_{12} = L_1 + A L_1 \varphi_2 + (L_2 - A L_1 - L_1) \varphi_2^2$
Элюирующая сила	$\varepsilon_{12}^* = \{ \varepsilon_1^* + [\varepsilon_2^* (1 + 6795A) - \varepsilon_1^*] \varphi_2 \} / (1 + A \varphi_2 - 0.3205A \varphi_2^2);$ $P_i = \Sigma \varphi_i P_i$ или $S_{12} = S_2 \varphi_2$
Стоимость, у.е./л	$V_{12} = V_2 \varphi_2 + V_1 (1 - \varphi_2)$
ПДК, мг/м ³	$C_{12} = C_2 \varphi_2 + C_1 (1 - \varphi_2)$

Итак, для 7 бинарных систем по 8 предложенным параметрам и заданным условиям, представленным в табл. 7.14., найдены $F_{об}$ (табл. 7.16.). Теперь можно ответить на вопрос, какой из апробированных систем следует отдать предпочтение при разработке методики анализа. Мы затрудняемся предсказать функцию температуры вспышки или температуры самовоспламенения смеси от ее состава. Однако, учитывая пожароопасность диэтилового эфира и ТГФ, их склонность к образованию пероксидов, сложность хранения эфиров как индивидуальных реактивов, логично в первую очередь отдать предпочтение этилацетату, затем хлороформу.

Из рис. 7.4. видно, что целесообразно говорить не о точечном оптимуме, а об оптимальном диапазоне составов ПФ. Обобщенная целевая функция на отдельных участках может изменяться медленно, оптимальное решение регулируется в первую очередь наложенными граничными условиями. Расчеты $F_{об}$ призваны определить стартовый состав ПФ, обладающий компромиссным набором физических и технико-эксплуатационных свойств, в качестве граничных условий можно вводить и условия оптимальной селективности, если они известны из опыта или по литературным данным, например, величины R_s выбранных соседних пиков, времена или объемы удерживания, величины фактора удерживания аналитов и т.д. С другой стороны, по величине $F_{об}$ можно сравнить методики, разработанные по одному техническому заданию. Предпочтение следует отдать той методике, которая имеет наибольшее положительное значение обобщенной целевой функции.

Таблица 7.16. Величина $F_{об}$ и оптимальный состав бинарных подвижных фаз гексан – модификатор, аналит – гидрофобные цветообразующие компоненты

Модификатор	$F_{об}$	φ_2
Диэтиловый эфир	0.10	0.25
Этилацетат	0.09	0.08
ТГФ	0.08	0.18
Хлороформ	0.06	0.50
Пропан-2-ол	0.02	0.006
Этанол	0.02	0.004
Диоксан	-0.03	0.09

Таблица 7.17. Пример таблицы поиска обобщенной целевой функции для микроколоночной ОФХ липидов

Система	φ_2	$T_{кип}$	ρ	η	УФ	у.е./л	ПДК	S	Раст.
Вода-метанол	0	100.0	1.000	0.89	195.0	19.2	1200	0.00	0.5
	0.026	97.8	0.998	0.93	195.3	19.3	1169	0.08	0.5
	0.075	94.7	0.994	1.00	195.8	19.4	1110	0.23	0.5
	0.1	93.3	0.991	1.04	196.0	19.4	1081	0.30	0.6
	0.15	90.8	0.986	1.12	196.5	19.6	1021	0.45	0.6
	0.2	88.6	0.980	1.21	197.0	19.7	961	0.60	0.6
	0.25	86.5	0.973	1.30	197.5	19.8	901	0.75	0.6
	0.4	80.9	0.949	1.58	199.0	20.2	722	1.20	0.7
	0.5	77.7	0.929	1.69	200.0	20.4	603	1.50	0.8
	0.6	74.7	0.906	1.66	201.0	20.6	483	1.80	0.8
	0.7	71.9	0.880	1.46	202.0	20.9	364	2.10	0.9
	0.75	70.6	0.867	1.31	202.5	21.0	304	2.25	0.9
	0.95	65.8	0.804	0.67	204.5	21.5	65	2.85	1.0
	1	64.7	0.787	0.54	205.0	21.6	5	3.00	1.0
$F_k^{норм}$		100.0	1.000	0.54	195	19.2	1200	3.00	1.0
Коэффициенты веса		0.15	0.05	0.2	0.1	0.05	0.05	0.2	0.2
Граничные условия	Min:	60	0.65	0.28	195	25	50	2.25	0.5
	Max:	100	1	1	254	55	1200	2.85	1
$F_{об}$		F_1	F_2	F_3	F_4	F_5	F_6	F_7	F_8
0.09		0.14	0.04	-0.21	-0.10	-0.06	0.05	0.12	0.11

Примечание: Жирным курсивом обозначены значения параметров, выходящих за допустимые границы. ПДК для воды – условно большая величина, позволяющая производить расчеты.

Особенно удобно по значениям $F_{об}$ оценивать преимущества изоэлюотропных составов. При заданной элюирующей силе предпочтение отдается составу с максимальным значением $F_{об}$. Дальнейшая процедура оптимизации методики сопряжена с улучшением селективности разделения. Если лучшая селективность обеспечивается не оптимальной по другим критериям подвижной фазой, следует применять методологию последовательных уступок.

Альтернативные элюенты, изоэлюотропные оптимальному элюенту, также могут быть использованы при необходимости на практике. Эта необходимость возникает при отсутствии в нужный момент в лаборатории или модификатора, или разбавителя. Они мо-

гут быть использованы для создания тернарной подвижной фазы, несколько отличающейся по селективности от бинарных элюентов. Для этих целей рекомендуют смешать две изоэлюотропные смеси в соотношении 1:1.

Рассмотрим пример поиска $F_{об}$ для ОФХ липидов (триглицериды высших карбоновых кислот, фосфолипиды) методом микроколоночной ВЭЖХ. На рис. 7.5 представлены $F_{об}$, построенные по параметрам, заданным в табл. 7.17. Эти параметры учитывают свойства анализов и особенности микроколоночной системы.

Наиболее широкий диапазон значений φ_2 , удовлетворяющих граничным условиям, дала смесь ацетонитрила с водой $\varphi_2=0.75-0.90\%$ модификатора ($F_{об}=0.01$). В то же время смесь метанол – вода дала более узкий разрешенный диапазон, но с более высоким максимум целевой функции ($F_{об}=0.09$). Для обращенной системы с ТГФ нет единого решения, удовлетворяющего всем граничным условиям. Подходящая элюирующая сила смеси находится в области составов со слишком высокой вязкостью.

Таким образом, в оболочке табличного процессора Microsoft Excel можно создавать базы данных, совмещенные с пакетом про-

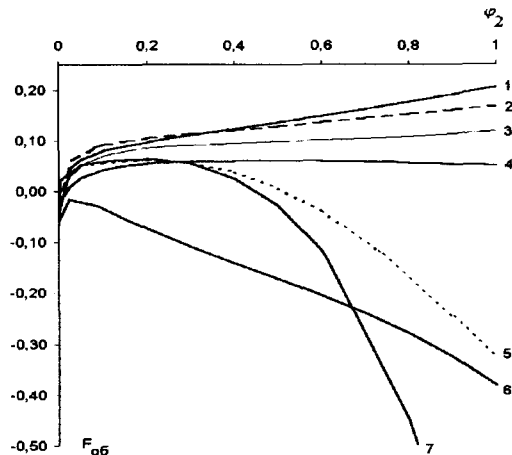


Рис. 7.4. Обобщенные целевые функции для системы “цветообразующие компоненты – “Миличром” (УФ) – бинарные ПФ гексан–модификатор”: 1 – диэтиловый эфир; 2 – этилацетат; 3 – ТГФ; 4 – хлороформ; 5 – этанол; 6 – диоксан; 7 – пропан-2-ол

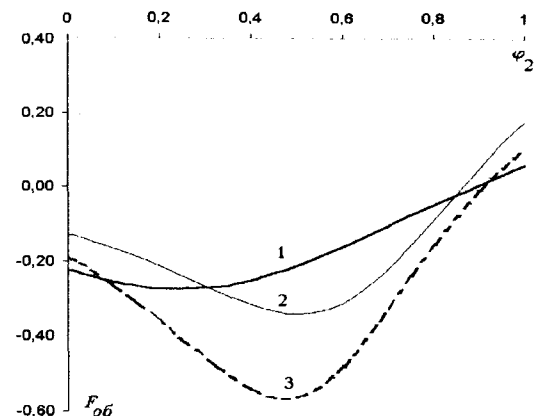


Рис. 7.5. Обобщенные целевые функции для системы “липиды – “Миличром” (УФ) – бинарные ПФ вода – модификатор”: 1 – ацетонитрил; 2 – метанол; 3 – ТГФ

грамм “поиск решения”, позволяющие количественно сравнивать *априори* или *апостериори* техническую оптимальность того или иного состава и делать правильный выбор из нескольких ПФ, подходящих по эффективности и селективности для хроматографического разделения. По величине обобщенной целевой функции можно сравнивать качество различных существующих методик, применяемых для анализа одного и того же анализа. Рис.7.4. и 7.5. дают общее представление о том, как выглядят типичные обобщенные функции для НФХ и ОФХ. Визуализация этих функций позволяет оператору легко сделать экспертную оценку качества методики и оценить возможности ее улучшения.

Создание алгоритмов поиска обобщенных функций не представляют большой сложности, несмотря на многофакторность, на наличие нескольких оптимизируемых параметров, включаемых в искомую функцию, оператор получает в итоге двухмерный наглядный график, легкий в интерпретации.

Если известны функциональные зависимости между параметрами хроматографической колонки и граничные условия, удовлетворяющие требованиям аналитической задачи, алгоритм поиска обобщенной функции может быть полезен при нахождении оптимального решения и в этом аспекте хроматографического процесса.

Вне рассмотрения остался важный этап – пробоподготовка. Этот этап включает выделение аналита из матрицы пробы с последующим концентрированием. В идеальном случае растворитель-экстрагент должен иметь такой же состав, что и элюент. При поиске компромиссного решения оптимизации подлежат практически те же технико-эксплуатационные характеристики, что и при проведении хроматографии, особенно если экстракцию и концентрирование сравнивать с препаративным вариантом ЖХ. Растворитель должен хорошо растворять аналит, иметь низкую токсичность, доступную стоимость, легко упариваться и регенерироваться, или хорошо смешиваться с компонентами ПФ, не мешать детектированию, обладать химической инертностью к компонентам хроматографической системы, не иметь слишком большую элюирующую способность и т.п.

ГЛАВА 8. ТЕХНИКА РАБОТЫ С КОЛОНКАМИ ДЛЯ ВЭЖХ

В данной главе рассмотрим проблемы, связанные с эксплуатацией хроматографических колонок. Эта прикладная тема привлекает внимание не только практиков, но и теоретиков жидкостной хроматографии, последние трактуют возникающие проблемы эксплуатации колонок, создают экспертные системы по выявлению неисправностей хроматографической системы и вырабатывают рекомендации по правильному обслуживанию этих систем [57,74,79,80,236]. Хроматографическая колонка является главным узлом хроматографической системы. При возникновении проблем с разделением часто бывает очень сложно определить, связаны ли они с самой колонкой или другими элементами хроматографической системы. Вместе с тем, причины проблем ищут в первую очередь в состоянии колонки, хотя в большинстве случаев эти проблемы вызваны другими факторами, например, изменениями состава подвижной фазы, ее расхода, колебаниями температур в системе и окружающей среде, различием образцов и т.д. При возникновении проблем, приводящих к неисправности колонки, необходимо предпринять своевременные грамотные действия по устранению причин, чтобы избежать этого в будущем.

8.1. Подготовка растворителя и пробы

Способ подготовки растворителя для ВЭЖХ зависит от того, какого качества растворитель имеется в наличии и для каких задач предполагается его использовать. Имеет значение также устойчивость растворителя к действию тепла, света и кислорода воздуха. Если используют растворители высокой чистоты, например, перегнанные в стеклянной аппаратуре, специально очищенные для ВЭЖХ и профильтрованные через фильтр с порами диаметром 0.5 мкм, их подготовка для работы проста: готовят смесь растворителей нужного состава, как правило, смешением по объему и дегазируют ее тем или иным способом. Если используют растворитель более низкого качества, в особенности технический, его подвергают нескольким дополнительным стадиям очистки: перегонке или ректификации в стеклянной аппаратуре,

часто с предварительной химической обработкой, осушкой и с обязательным фильтрованием перед дегазацией через фильтр с порами диаметром 0.2-0.5 мкм. Методики очистки некоторых растворителей приведены в разд. 5.6. Пригодность подготовленного растворителя проверяют непосредственно на хроматографе в диапазоне чувствительности и расходов, с которыми предстоит работать. Недостаточную чистоту растворителя устанавливают по шумам нулевой линии, превышающим допустимые, по большому дрейфу нулевой линии, по невозможности отрегулировать нулевое положение регистрирующего устройства на чувствительных шкалах детектора. Такая проверка особенно важна при работе в градиентном режиме, для которого необходимы растворители наиболее высокого качества.

Выделяющиеся из недеаэрированной ПФ пузырьки воздуха приводят к нестабильности нулевой линии детектора, ухудшают эффективность колонок для эксклюзионной хроматографии, заполненных полужесткими гелями, могут вызвать окисление лабильных соединений и некоторых привитых фаз. Поэтому необходима деаэрация ПФ. Ее проводят кипячением, продувкой гелием, воздействием вакуумом или ультразвуком. Кипячение с обратным холодильником 5-10 мин очень эффективно для индивидуальных, но нежелательно для смешанных растворителей, содержащих компоненты со значительной разницей в температурах кипения. Деаэрированный растворитель переносят в сосуд для ПФ с помощью сифона или передавливанием. В обоих вариантах подающая трубка должна практически упираться в дно сосуда, чтобы подача происходила под слой жидкости. Переливать растворитель через воронку не рекомендуется, так как при этом в нем снова растворяется некоторое количество воздуха. Лучше всего дегазацию проводить непосредственно в сосуде для ПФ. Перед установкой сосуда с элюентом в хроматографическую систему целесообразно продуть объем над дегазированным растворителем аргоном или азотом. Если при дегазации растворителя сосуд для подвижной фазы приходится отсоединять от хроматографической системы, при этом нужно вынуть из него трубку, на конце которой надет фильтр, следует немедленно опустить фильтр в заранее приготовленный стакан с тем же растворителем. Если оставить фильтр на воздухе, то растворитель будет достаточно интенсивно

испаряться с его пористой поверхности, что приведет к охлаждению фильтра и конденсации на нем атмосферной влаги. Кроме того, во внутреннюю полость фильтра при этом попадет воздух, который потом придется удалять из системы.

8.1.1. Особенности работы с водными растворителями

Вода и элюенты, готовящиеся на ее основе, нуждаются в особом внимательном отношении, так как вода очень легко загрязняется, поглощая газы и летучие вещества из воздуха лабораторного помещения. Некоторые водные растворы, особенно буферные фосфатные, являются питательной средой, в которой быстро размножаются многие бактерии, образуя частицы колоний. Эти частицы способны засорять фильтры, нарушать работу клапанов, портить колонки и т.д. Дегазированные водные растворы очень быстро поглощают кислород из воздуха. Следует, как правило, использовать для ВЭЖХ свежеприготовленную бидистиллированную воду. Приготовив растворитель, следует дегазировать его, отфильтровать и затем быстро использовать [57].

Если растворитель стоял некоторое время, его нужно перед работой проверить на отсутствие взвесей и опалесценции, профильтровать и дегазировать. Лучше всего готовить и использовать растворитель в количестве, необходимом на день работы.

8.1.2. Подготовка раствора пробы

Раствор пробы, как правило, нужно готовить в том же растворителе, который используют для работы. Этот способ является наилучшим, так как не дает (или почти не дает) ложных пиков на хроматограмме, связанных с вытеснительными пиками, прохождением через детектор другого растворителя и откликом детектора на изменение при этом показателя преломления.

Если есть затруднения при растворении пробы, можно попытаться использовать для растворения один из компонентов рабочего растворителя, например, более полярный, а затем уже добавить другие компоненты до получения требуемого состава. Можно ускорить или улучшить растворение, обработав пробу в ультразвуковой ванне.

Можно применять и нагревание, но при этом всегда следует учитывать возможность выпадения осадка образца при охлаждении, изменения за счет этого состава раствора и результатов анализа.

Если в пробе присутствуют нерастворимые примеси (соли, полимеры и др.), анализ которых не представляет интереса, такие пробы после растворения должны быть профильтрованы через фильтр с порами 0.2-0.5 мкм под вакуумом или, что более удобно, под давлением; можно отделять твердые частицы на центрифуге. Использование специальных центрифужных пробирок для фильтрации, состоящих из двух частей, разделенных фильтром с порами 0.5 мкм, позволяет быстро отфильтровать пробу от осадка.

Если пробу не удастся приготовить из компонентов рабочего растворителя из-за плохой растворимости образца, следует попытаться подобрать растворители, используя литературные данные по растворимости или метод проб и ошибок. Важно, чтобы этот растворитель был совместим с ПФ. Когда растворитель выбран, всегда до того, как ввести приготовленный раствор пробы, сделайте холостой тестовый ввод такого же объема выбранного растворителя, но без растворенного образца. Это дает возможность оценить, какие ложные пики при вводе растворителя будут образовываться. Наконец, следует ввести раствор образца в этом растворителе. Если растворитель сильно отличается от того, который используют для элюирования, то кроме образования ложных пиков, возможно выпадение части образца в осадок в колонке или инжекторе, когда проба смешивается с элюентом. Иногда при смешивании таких разных растворителей существенно падает эффективность разделения или возможно даже исчезновение пиков компонентов пробы.

Для выделения и концентрирования аналита из матрицы в последнее время применяют патроны с сорбентом для проведения твердо-фазной экстракции. Пробу вымывают из патрона, при необходимости упаривают экстрагент в токе инертного газа (азота или гелия), затем растворяют в элюенте.

8.1.3. Подготовка растворов полимерных образцов

Подготовка растворов полимеров для эксклюзионной хроматографии имеет свои особенности. Полимер можно растворять только в ра-

створителе, используемом в качестве ПФ, желательно в той же его партии, которую применяют в данный момент. Это особенно важно, если полимер содержит низкомолекулярные компоненты (например, антиоксиданты, стабилизаторы), пики которых могут накладываться на пики примесей в растворителе, так как все они элюируются с объемом полного проникания. Полимеры растворяются значительно медленнее низкомолекулярных соединений. В большинстве случаев растворение можно ускорить, умеренно нагревая раствор подогретым воздухом и одновременно перемешивая содержимое сосуда, не допуская закипания и улетучивания растворителя. Растворимость полимеров снижается по мере роста молекулярной массы. Нужно быть полностью уверенным в том, что в выбранных условиях анализа полимер растворяется целиком. Для этого необходимо, чтобы растворимость наиболее высокомолекулярных образцов была как минимум в 2-3 раза выше, чем рабочая концентрация раствора. Синтетические полимеры часто содержат сшитые нерастворимые частицы (гель), которые не видны при рассмотрении раствора на просвет. Эти частицы иногда можно обнаружить, наклоняя сосуд с раствором: прилипшие к стенке частицы достаточно хорошо заметны. Вероятность присутствия нерастворимых частиц при анализе полимеров значительно выше, чем в случае анализа низкомолекулярных соединений, поэтому анализируемые растворы полимеров нужно обязательно фильтровать под давлением через фильтр с порами ≤ 0.5 мкм. Подготовка растворов и их ввод в кран-дозатор усложняются при работе с полимерами, для растворения которых требуется температура выше 50 °С. В этих случаях нужно принимать все необходимые меры, чтобы предотвратить или устранить выпадение полимера из раствора. Если анализируемый образец твердый, то он должен быть перед растворением измельчен. Растворение полимера чаще всего ведут в небольшом сушильном шкафу, температура которого на 5-10°С превышает температуру, при которой проводят анализ. Фильтрацию раствора проводят при температуре проведения анализа $\pm 0.5^\circ\text{C}$ в специальных обогреваемых фильтрах с регулированием температуры обогрева. Фильтрат снова переносят в тот же сушильный шкаф и выдерживают там для нагревания и растворения осадка, который мог выпасть во время фильтрации. Раствор переносят в кран-дозатор шприцем с полым стеклянным поршнем, который запол-

нен очень мелкими алюминиевыми опилками и предварительно нагрет в том же сушильном шкафу. Данные операции при температуре более 60°C приходится проводить в шерстяных перчатках и по возможности быстро. Несмотря на все принятые меры предосторожности, наиболее высокомолекулярные фракции полимера могут выпасть из раствора. Однако их частицы столь малы, что не мешают заполнению петли. Чтобы они успели снова раствориться в термостатируемой петле крандозатора, пробу вводят в колонку через 5-10 мин после ее заполнения. Описанная подготовка пробы достаточно длительна, а при высоких температурах возможны окисление и деструкция полимера. Приведенные здесь рекомендации носят общий характер; детали анализа конкретных полимеров уточняют в специальной литературе [57].

8.2. Типичные неисправности, способы обнаружения и устранения

В табл. 8.1.-8.5. приведены наиболее общие проблемы, приводящие к неисправности колонки, вместе с возможными причинами и способами их грамотного устранения. Обращаясь к данной таблице, вы сможете точно определить причину неисправности и устранить её. Если в системе слишком высокое давление, необходимо последовательно двигаясь от насоса к колонке, найти место засорения и устранить его.

Таблица 8.1. Проблема – слишком высокое давление в системе

Возможная причина	Необходимые действия
1. Загрязнён входной фрит колонки.	Промойте колонку медленным обратным потоком подвижной фазы (в 5-6 раз меньшим, чем рабочий прямой поток) для удаления механических частиц или замените входной фрит.
2. Загрязнён фильтрующий элемент "in-line" фильтра (предколоночного фильтра) между инжектором и колонкой.	Замените фильтр.
3. Загрязнена предколонка.	Замените предколонку.

продолжение таблицы 8.1.

Возможная причина	Необходимые действия
4. Используется колонка с малым внутренним диаметром.	Уменьшите расход подвижной фазы.
5. Колонка набита сорбентом с малым размером частиц.	Используйте более короткую колонку.
6. Неисправен манометр, тензопреобразователь	Проверьте давление другим манометром, замените указатель давления.
7. Загрязнено устройство ввода пробы	Промыть или заменить инжектор
8. Забит капилляр	Заменить капилляр
9. Загрязнена ячейка детектора.	Промыть ячейку детектора
10. Увеличилась объемная скорость	Проверить расход элюента

Таблица 8.2. Проблема – существенное изменение времени удерживания одного и того же пика (более чем на 10%)

Возможная причина	Необходимые действия
1. Загрязнение колонки.	Промойте или замените колонку.
2. Потеря привитой фазы	Замените колонку
3. Колонка не уравновешена.	Промойте колонку подвижной фазой объемом не менее семи геометрических объемов колонки.
4. Колонка перегружена.	Уменьшите количество вводимого образца.
5. Изменился расход подвижной фазы	Проверить расход элюента
6. Изменился состав подвижной фазы	Заменить элюент
7. Изменилась температура	Проверить термостат

Таблица 8.3. Проблема - снижение эффективности колонки (числа теоретических тарелок)

Возможная причина	Необходимые действия
1. В колонке образовалось пустое пространство (проседание сорбента или образование канала).	Замените колонку.
2. "Износилась" предколонка.	Замените предколонку.
3. Экстраколоночные эффекты (повреждение или неправильная установка фитингов и соединений)	Минимизировать факторы, вызывающие эффекты, проверить и переустановить соединения
5. Увеличение объёма вводимого образца	Проверить систему или программу ввода образца
6. Растворение образца в другом, более сильном по элюирующей способности, чем подвижная фаза, растворителе	Изменить пробоподготовку
7. Изменения в составе подвижной фазы	Заменить подвижную фазу

Возможная причина	Необходимые действия
10. Изменения состава подвижной фазы (концентрации буферного раствора, pH, количества ион- парного реагента и т.д.)	Заменить подвижную фазу
11. Компоненты пробы выпадают в осадок	Изменить пробоподготовку, состав подвижной фазы
12. Изомеризация, диссоциация, тауомерные превращения компонентов пробы	Изменить состав подвижной фазы

Таблица 8.5. Проблема – наличие неидентифицируемых ("лишних") пиков

Возможная причина	Необходимые действия
1. Проба содержит примеси, не предусмотренные методикой анализа	Проверить калибровку, проанализировать стандартные образцы.
2. Загрязнена колонка.	Промойте или замените колонку.
3. Износилась предколонка.	Замените предколонку.
4. Загрязнен инжектор	Промойте инжектор
5. Загрязнена подвижная фаза	Замените элюент
6. Воздушные пузырьки в системе	Деаэрировать элюент

8.3. Методические аспекты обеспечения высокой эффективности колонки

Большинство пользователей хроматографических колонок хотели бы максимально продлить срок службы этого важнейшего элемента хроматографа. Рассмотрим три основные причины выхода из строя наиболее распространённого на сегодняшний день типа колонок – колонок, заполненных обращённо-фазовыми сорбентами.

Первая причина – *потеря химически привитой фазы*. В настоящее время около 90% всех анализов методом ВЭЖХ выполняются на хи-

Таблица 8.4. Проблема – раздвоение пиков, наличие "хвостов" у пиков

Возможная причина	Необходимые действия
1. Загрязнена колонка.	Промойте или замените колонку.
2. Входной фрит колонки забит механическими примесями.	Замените входной фрит колонки.
3. Потеря привитой фазы.	Замените колонку.
5. Проседание сорбента.	Замените колонку.
6. Образование канала в сорбенте.	Замените колонку.
7. Износилась предколонка.	Замените предколонку.
8. Экстраколоночные эффекты (повреждение или неправильная установка фитингов и соединений)	Минимизировать факторы, вызывающие эффекты, проверить и переустановить соединения
9. Колонка перегружена	Уменьшить объём вводимой пробы

мически привитых фазах. Разрушение химических связей между привитыми группами и силикагельной матрицей приводит к изменению времён удерживания и разрешения, а также к тому, что пики “хвостят”. Причина – гидролиз силоксановых связей силикагелевой матрицы с привитыми группами или эндэпирующим реагентом, применяемым для устранения влияния остаточных силанольных групп на поверхности силикагеля. Гидролиз наиболее ярко выражен при использовании подвижных фаз с $\text{pH} < 3$. Для предотвращения гидролиза при необходимости применения сильноокислых подвижных фаз ($\text{pH} < 3$) следует использовать специально предназначенные для этого колонки (в том числе и с силикагельной матрицей), например, обращённо-фазовые колонки серии Luna фирмы Phenomenex. Данные колонки способны стабильно работать в диапазоне $\text{pH}=1.5 - 10$ благодаря высокой чистоте используемого силикагеля и однородности его покрытия привитыми группами или же вместо силикагелевой основы колонки использовать сорбент на полимерной основе. Обычные же колонки, допускают работу с подвижными фазами, pH которых лежит в диапазоне 3-7. При работе вблизи нижней границы данного диапазона следует избегать повышения температур подвижной фазы выше 60°C .

Вторая причина – образование пустого пространства на входе в колонку, вызванное проседанием сорбента. Это приводит к резкому снижению эффективности колонки (резкому уменьшению числа теоретических тарелок N), а также ухудшению разрешения, увеличению размывания пиков, их расщеплению на дублеты и появлению “хвостов”. Причинами проседания могут быть: а) повышенное (более допустимого) давление на входе в колонку или гидравлический удар (одна из наиболее часто встречающихся причин), вызванный резким сбросом давления; б) плохо набитые колонки, “проседающие” в процессе использования; в) в результате использования подвижных фаз с высоким значением pH произошло растворение силикагеля в колонке. Для предотвращения этого следует поддерживать в системе давление, не превышающее 17-19 МПа. Не допускайте скачков давления. Помните, что при смене колонки или ПФ необходимо дождаться снижения давления до 1-1.5 МПа и только после этого приступить к демонтажу колонки и промывке системы. При проседании сорбента колонки, вызванном гидравлическим ударом (сорбент на входе про-

седаёт обычно более чем на 1-2мм), хроматографические параметры ухудшаются скачкообразно. В этом случае производитель (поставщик), как правило, не несёт гарантийных обязательств, так как подобные действия являются грубейшим нарушением условий эксплуатации *любой* (не только обращённо-фазовой) колонки для жидкостной хроматографии. Приобретайте хроматографические колонки у надёжных и известных поставщиков, документально обеспечивающих качество своей продукции (наличие паспорта и гарантий). Проседание сорбента, вызванное плохой набивкой, как правило, происходит в процессе первичной эксплуатации изделия, т.е. при тестировании производителем (поставщиком) или в период гарантийного срока.

При использовании подвижной фазы с $\text{pH} > 7$ её температура не должна превышать 40°C во избежание растворения силикагелевой матрицы. При необходимости применения щелочных подвижных фаз ($\text{pH} > 7$) используйте специально предназначенные для этого силикагелевые колонки (обращённо-фазовые колонки серии Luna фирмы Phenomenex способны стабильно работать вплоть до $\text{pH}=10$) или же колонки на полимерной основе. Для остальных колонок pH подвижной фазы не должен превышать 7.

Одной из возможных причин неисправности колонки может стать очень прочное удерживание на привитой фазе отдельных компонентов пробы или подвижной фазы. Это приводит к ухудшению разрешения и изменению времён удерживания пиков. Это также может пагубно повлиять на форму пиков. Механические примеси и выпавшие в осадок компоненты пробы или соли буферных растворов также могут испортить колонку, забивая входной фрит или сорбент. Причины загрязнения колонки: а) проба содержит компоненты, не смываемые с колонки подвижной фазой данного состава. Это часто наблюдается при использовании подвижных фаз с малым содержанием органического компонента; б) примеси в подвижной фазе адсорбируются на неподвижной фазе колонки. Это часто происходит при использовании ион-парных реагентов или других добавок в сочетании с подвижной фазой с малым содержанием органической составляющей и изократическим режимом элюирования; в) механические примеси в пробе или подвижной фазе, забивающие входной фрит колонки.

Таблица 8.6. Правила эксплуатации обращенно-фазовой колонки

Сводите к минимуму скачки давления в хроматографической системе	Ввод пробы осуществляйте резким поворотом ручки инжектора для снижения гидравлического удара. Обеспечьте наименьшую пульсацию насосов, вызванную, как правило, непостоянной объёмной скоростью подвижной фазы (фаза не дегазирована). Избегайте гидравлических ударов.
Используйте предколонку или "in-line" фильтр с диаметром пор 0.5 мкм.	Подсоедините их в линию между инжектором и аналитической колонкой. Фильтр задержит крупные механические частицы, а предколонка предотвратит попадание сильно удерживаемых примесей на аналитическую колонку.
Как можно чаще промывайте колонку сильным растворителем.	Обычно бывает достаточно промыть колонку 100% ацетонитрилом. Тем не менее, если необходим более сильный (менее полярный) растворитель, то можно применить метиленхлорид, являющийся одним из наиболее сильных растворителей в обращенно-фазовой хроматографии. При промывке помните о совместимости растворителей и возможности образования осадков. Многие сильные органические растворители не смешиваются с водными подвижными фазами и буферами, поэтому до и после использования метиленхлорида необходимо перемыть колонку пропан-2-олом.

продолжение таблицы 8.6.

Перед вводом "грязной" пробы в колонку необходимо провести пробоподготовку для удаления механических частиц и сильно удерживающихся на колонке примесей.	В качестве пробоподготовки используйте такие приёмы, как твердофазная экстракция, фильтрация через пористый фильтр и центрифугирование
Колонки на силикагелевой основе используйте с подвижными фазами, pH которых лежит в диапазоне от 3 до 7.	Для работы за пределами данного диапазона используйте специально предназначенные для этого силикагелевые колонки или колонки на полимерной основе
При работе с буферными растворами используйте только свежеприготовленные	Долго стоящие водные растворы быстро "зацветают", что приводит к нестабильности базовой линии и

Для предупреждения этой ситуации, требуется очистка образца перед инъекцией, подразумевающая фильтрацию или центрифугирование пробы для удаления механических примесей и твердофазную экстракцию для удаления высоко удерживаемых компонентов пробы. Используйте только особо чистые растворители и реактивы для подвижной фазы и не забывайте фильтровать буферные растворы. По возможности откажитесь от применения ион-парных реагентов, в качестве ион-парных реагентов при работе на обращенной фазе не используйте вещества, содержащие в углеродных цепях более восьми атомов углерода (например, применение тетрадециламмоний бромида приводит к его необратимой сорбции на обращенной фазе). Для того чтобы смыть высоко удерживаемые примеси с неподвижной фазы колонки, промойте её в течение продолжительного времени сильным растворителем (таким как 100% ацетонитрил). Поместите в линию между инжектором и колонкой предколонку, которая будет адсорбировать несмывающиеся компоненты и защищать аналитическую колонку. Не забывайте своевременно менять предколонки.

Правила эксплуатации нормально-фазовых колонок аналогичны изложенным в табл. 8.6. Они более требовательны к процедуре

Таблица 8.7. Параметры, по которым контролируют изменения качества колонки

Число теоретических тарелок, N	Наиболее частыми причинами уменьшения числа теоретических тарелок являются образование полостей в колонке и её загрязнение. Пики на хроматограмме становятся шире, эффективность падает. Проверка числа N , можно обнаружить проблемы ещё до того, как они повлияют на разделение.
Фактор удерживания, k	Изменение фактора удерживания при одних и тех же условиях хроматографирования указывает либо на смывание химически привитой фазы с колонки, либо на загрязнение колонки несмываемыми примесями. Изменения k могут быть вызваны изменениями состава подвижной фазы, что часто приводит к ошибочному мнению о неисправности колонки.
Селективность, α .	Изменение селективности является ещё одним свидетельством, наряду с фактором удерживания, смывания привитой фазы, загрязнения колонки или изменения состава подвижной фазы.
Коэффициент асимметрии, A_s .	Коэффициент асимметрии является мерой симметричности пика. Увеличение коэффициента асимметрии (появление "хвоста") пика указывает на возможное образование полости в колонке, но также может быть вызвано взаимодействием полярного образца с силанольными группами силикагеля в результате смывания привитой фазы.
Обратное давление колонки, ΔP	Увеличение обратного давления колонки указывает, как правило, на то, что входной фрит забился механическими частицами. Резкое увеличение обратного давления может быть также вызвано образованием полости в результате разрушения упаковки колонки.

регенерации, колонки для НФХ также не рекомендуется хранить в сухом виде.

Для продления службы аналитической колонки применяют так называемые предколонки. Основная роль, которую играет предколонка в хроматографической системе, – роль ловушки сильно удерживающихся на аналитической колонке примесей и механических частиц. Она устанавливается в линии между инжектором и аналитической колонкой. Защищая при помощи предколонки свою аналитическую колонку, можно существенно продлить срок ее службы. При этом важное значение имеет своевременная замена износившейся предколонки. Несмотря на то, что точно определить необходимость замены предколонки при работе с данным образцом и подвижной фазой можно лишь при наличии соответствующего опыта, существует несколько количественных параметров, способствующих принятию верного решения. Среди них – число теоретических тарелок N , рабочее давление P и разрешение R_s . Если N , P или R_s изменились более чем на 10%, необходимо заменить предколонку.

Несмотря на то, что вышеперечисленные параметры являются достоверными критериями принятия решения о замене предколонки, нельзя быть на сто процентов уверенным в том, что предколонка должным образом защищает аналитическую колонку. Аналитическая колонка может загрязняться из-за перенасыщения предколонки и без видимого изменения вышеперечисленных параметров. Поэтому лучше произвести замену предколонки как можно раньше. В отсутствии иной информации хорошей привычкой является замена предколонки после 150 вводов пробы или 1000 объёмов подвижной фазы.

8.4. Оптимизация эффективности колонок с малым внутренним диаметром

Многие хроматографисты изначально отдают предпочтение стандартным колонкам 250x4.6 мм для разработки метода разделения, так как они обеспечивают прекрасное разрешение и приемлемое время анализа. Когда речь идёт о разработке метода для рутинного анализа, необходимо рассмотреть все возможные варианты

для выбора единственного, обеспечивающего наименьшее время и стоимость анализа.

Одним из способов разработки экономичного метода является применение колонок с меньшим внутренним диаметром. Колонки с внутренним диаметром 3.0, 2.1 мм или 2.0 мм обладают рядом преимуществ. Одно из них – снижение расхода подвижной фазы, а значит, меньшие затраты элюента и в конечном итоге меньшая стоимость анализа. Одновременно достигается минимизация ввода образцов, количество которых ограничено. Колонки с внутренним диаметром 3 мм допускают уменьшение количества вводимого вещества приблизительно в 2 раза. Колонки с внутренним диаметром 2 мм допускают уменьшение количества вводимого вещества приблизительно в 5 раз. Снижение объёма вводимой пробы позволяет использовать меньшее количество реагентов на пробоподготовку. Миниатюризация колонок обеспечивает лучшую совместимость со специфическими детекторами – масс-спектрометром и ЯМР-спектрометром. К недостаткам перехода на колонки меньшего диаметра следует отнести ощутимое снижение эффективности за счет увеличения вклада в размывание пика коэффициента поперечной диффузии, а также снижение воспроизводимости результатов анализа за счет большей ошибки при вводе малых количеств вещества.

Единственный способ снизить потребление подвижной фазы – это использовать колонки с меньшим внутренним диаметром, чем стандартный 4,6 мм. Колонки с внутренним диаметром 3 и 2.1 мм снижают расход подвижной фазы на 60 – 80%. В табл. 8.8. приведены соотношения внутреннего диаметра колонки, её объёма и потребления подвижной фазы.

Таблица 8.8. Эксплуатационные параметры колонок разного размера

Размеры колонки, мм	V _м , мл	Объём пика, мкл	Потребление элюента, мл	Экономия элюента, %
4.6x250	2.50	550	18.9	0
4.6x150	1.50	430	11.4	40
3.0x250	1.06	240	8.0	58
3.0x150	0.64	188	4.8	74
2.1x150	0.3	94	2.4	87

Уменьшение внутреннего диаметра колонки приводит к уменьшению её объёма. Именно благодаря меньшему объёму колонки, имеется возможность снижения нагрузки на колонку, т.е. уменьшение количества и объёма вводимой пробы. С уменьшением объёма колонки происходит уменьшение объёма пика (см. таб. 8.8.). Иными словами, при введении одного и того же образца на колонки с внутренними диаметрами 4.6 и 3 мм объём пика будет меньше на колонке 3 мм, следовательно, образец будет более концентрированным. Однако следует помнить, что предел детектирования при этом не изменится, так как он определяется характеристиками детектора.

Для достижения оптимальной эффективности (*N*) необходимо, чтобы ВЭЖХ система была совместима с колонками с малым внутренним диаметром. Объём пиков заметно уменьшается с уменьшением внутреннего диаметра колонки. Особенно сильно несовместимость ВЭЖХ систем сказывается для компонентов пробы с минимальным значением *k*, объём пиков которых обычно самый меньший на хроматограмме.

Хорошо сконструированная ВЭЖХ система способна обеспечивать высокую эффективность даже при объёме пика 80 мкл. Для пиков с объёмом менее 80 мкл требуется особым образом сконфигурированная ВЭЖХ система. Стандартные колонки диаметром 4.6 мм, а также 3 мм могут применяться практически с любым хроматографом и обуславливать оптимальную эффективность. Лимитирующим фактором является только рабочее давление насоса. Эти колонки не совместимы со шприцевым насосом хроматографов Милихром и Обь. Что касается колонок с малым диаметром 2.1 мм, то они требуют дополнительной оптимизации ВЭЖХ системы для обеспечения должной эффективности. Микроколонки (внутренний диаметр менее 2.1 мм) могут использоваться только в специальных микроколоночных хроматографических системах, в которых минимизированы экстраколоночные эффекты.

При использовании колонки с малым внутренним диаметром (<4.6 мм) в целях экономии элюента или образца необходимо помнить, что простая замена одной колонки на другую, с меньшим диаметром, без изменения объёмной скорости подвижной фазы ухудшит разрешение, а также подвергнет риску колонку и всю хроматографическую систему. При переходе на колонку с тем же сор-

бентом и длиной, но с меньшим диаметром необходимо снизить объёмную скорость потока подвижной фазы для воспроизведения времён удерживания и разрешения пиков исходной хроматограммы. При переходе от колонки с диаметром D_1 к колонке той же длины, но с меньшим диаметром D_2 объёмную скорость элюента необходимо изменить, умножив на коэффициент X для воспроизведения времён удерживания и разрешения пиков:

$$X=(D_2/D_1)^2 \quad (8.1)$$

Например, при переходе от колонки 250 x 4.6 мм к колонке 250 x 3 мм объёмная скорость должна быть умножена на 0.4, так как $X=(3/4.6)^2=0.4$.

Результаты соответствующих расчётов при переходе от колонки 250 x 4.6 мм к колонкам с меньшими внутренними диаметрами приведён в табл. 8.9. При переходе к более короткой колонке с тем же размером частиц не обязательно экспериментально определять, сможет ли она обеспечить оптимальное разрешение для поставленной задачи, если в наличии имеются хроматографические данные, полученные на длинной колонке. Ряд несложных вычислений заметит утомительные процедуры смены, уравнивания колонки и Разрешение R_s прямо пропорционально квадратному корню числа теоретических тарелок N . А так как число теоретических тарелок N изменяется пропорционально изменению длины колонки, то разрешение будет изменяться пропорционально квадратному корню изменения длины колонки:

$$R_{s2}=R_{s1}(L_2/L_1)^{1/2}, \quad (8.2)$$

где R_{s2} – разрешение второй колонки, а R_{s1} – разрешение первой колонки, L_2 – длина второй колонки L_1 – длина первой колонки.

По аналогии с разрешением можно предсказать, как изменяется время анализа и перепад давления с изменением длины колонки.

Таблица 8.9. Соотношение расходов ПФ на колонках разного диаметра

Размеры колонки, мм	Относительная объёмная скорость, мл/мин
4.6x250	1.0
3.0x250	0.4
2.1x250	0.2

$$T_2 = T_1(L_2/L_1), \quad (8.3)$$

$$P_2 = P_1(L_2/L_1), \quad (8.4)$$

где T_1 – время анализа на первой колонке, T_2 – время анализа на второй колонке, P_1 – давление на первой колонке, а P_2 – давление на второй колонке.

Например, при работе на колонке длиной 250 мм разрешение между двумя наиболее близкими пиками (критически разделяемыми компонентами) равняется 3.5, анализ занимает 20 минут, а давление в системе – 7 МПа. Возможен ли переход на колонку 150 мм, если для данного анализа требуется разрешение не менее 2.5, и как смена колонки повлияет на время анализа и давление в системе? Расчёты показывают, что $R_{s2}=3.5(15/25)^{1/2}=2.7$, $T_2=20(15/25)=12$ мин, а $P_2=7(15/25)=4.2$ МПа. Таким образом, видно, что колонка длиной 150 мм обеспечит необходимое разрешение, а помимо этого сократит время анализа на 8 мин, сэкономив тем самым 40% ПФ, и снизит обратное давление в системе. Однако это давление не пригодно для микроколоночного шприцевого насоса хроматографа Милихром. Для последнего необходимо дополнительно уменьшать длину колонки. Вышеприведённый пример демонстрирует, как можно оперативно определить, подходит ли более короткая колонка для данного анализа.

Обсудим вкратце экстраколоночные эффекты, роль которых так велика в микроколоночной ВЭЖХ. Суммарная ширина пика зависит от объема колонки, объема пробы и экстраколоночного объема. Под последним понимают сумму инъекционного объема, объема “in-line” фильтра, объемов капилляров и соединений между инжектором и колонкой, а также колонкой и ячейкой детектора. Согласно железному правилу хроматографии, экстраколоночный объем в хроматографической системе должен быть сведён к минимуму для достижения оптимальной эффективности. Существует два очевидных свидетельства существования чрезмерного экстраколоночного размывания (ЭКР) в ВЭЖХ системе для данной колонки: 1) число теоретических тарелок на практике существенно меньше (20% и более), чем заявлено производителем; 2) число теоретических тарелок начальных пиков значительно меньше (30% и более), чем у поздних.

Для того чтобы снизить влияние дисперсии, всегда надо свести к минимуму внутренний диаметр и длину капилляра между инжектором и колонкой, а также колонкой и детектором. В некоторых случаях применяют спиральные капилляры необходимой длины. Спиральный капилляр усиливает радиальную диффузию, разрушая параболический профиль потока, что, в свою очередь, заметно уменьшает диффузию в капилляре. Результатом улучшенного радиального массопереноса образца является меньшее размывание пиков по сравнению с прямым капилляром.

Разумным балансом между практическим удобством и минимальным внутренним диаметром является использование капилляров минимальной длины с внутренним диаметром 0.25 мм между инжектором и колонкой, а также колонкой и детектором. Несмотря на то, что доступны капилляры и меньшего диаметра (0.17 и 0.13 мм), их следует использовать лишь в крайнем случае, так как существует повышенный риск забивания механическими примесями, присутствующими в пробе и подвижной фазе. Использование “in-line” фильтров и предколоннок между инжектором и колонкой также может быть источником ЭКР пиков. При использовании таких фильтров убедитесь в отсутствии у них большого мёртвого объёма. Сорбент предколонки должен быть подобран таким образом, чтобы число теоретических тарелок комбинации предколонка – аналитическая колонка не было меньше, чем у одной аналитической колонки.

По правилам хроматографии объём кюветы детектора не должен превышать 1/10 объёма интересующего пика. Это означает, что при объёме пика 50 мкл должна использоваться кювета объёмом не более 5 мкл. Высокоэффективные колонки крайне чувствительны к малейшим изменениям объёма кюветы, острые пики, полученные на колонках с малым внутренним диаметром, легко теряют свои свойства, если кювета подобрана неверно. Также следует принимать во внимание геометрию кюветы, а именно её длину и радиус. Несмотря на то, что эффективность микроколоннок увеличивается при использовании кювет малого объёма, следует помнить, что меньший объём кюветы в целом означает меньшую чувствительность, так как выходной сигнал спектрофотометрического детектора прямо пропорционален длине оптического пути (ячейки ма-

лого объёма, как правило, короче). Это же правило минимизации объёма кювет справедливо и для других оптических детекторов (кроме рефрактометров).

Ещё одним фактором, влияющим на размывание пиков, является термостат детектора, стабилизирующий температуру образца на входе в ячейку. Его влияние аналогично капилляру, поэтому большинство производителей используют для термостатов минимальной длины капилляры с внутренним диаметром 0.17-0.13 мм.

Наиболее важен относительный вклад самой колонки в размывание пика. Если величина объёма колонки значительно превышает экстраколоночный объём, то небольшие изменения последнего несильно повлияют на объём концентрационной зоны аналита. С другой стороны, чем меньше объём колонки, тем важнее становится ЭКР. Кроме того, как следует из табл. 8.11., помимо геометрических размеров колонки, большое значение имеет также диаметр частиц сорбента, которым набита колонка.

Таблица 8.10. Потеря эффективности, вызванная ячейками с большим объёмом

Размеры колонки, мм	Объём ячейки, мкл	Приведенная эффективность, N/м	Потеря эффективности, %
150x4.6	1	98096	—
	8	90888	7
150x2.0	1	78077	—
	8	52939	32
150x1.0	1	56551	—
	8	16277	67

Таблица 8.11. Объём хроматографического пика в зависимости от размеров колонки и частиц сорбента

Размер колонки, мм	Диаметр частиц, мкм		
	10	5	3
	Объём пика, мкл		
250x4.6	291	206	159
150x4.6	225	159	123
100x4.6	183	129	100

В тех случаях, когда образец растворён в подвижной фазе (или более слабом растворителе, чем подвижная фаза) и инъекционный объём его составляет 10-50 мкл, вклад образца в размывание пиков незначителен, если используются стандартные колонки 150 или 250 x 4.6 мм. Если же в колонку вводятся образцы гораздо большего объёма, чем 50 мкл или образцы свыше 25 мкл, растворённые в сильных растворителях, возможно снижение числа теоретических тарелок за счёт ряда инъекционных эффектов, например, искривление или расщепление пиков. Чтобы выявить это, следует уменьшить объём вводимого в колонку образца до 10-20 мкл, настроить детектор таким образом, чтобы высота пиков осталась прежней и проверить N и R_s интересующих пиков. Необходимость изменения процедуры анализа возникает в том случае, если с уменьшением объёма вводимого образца (меньший инъекционный объём или более слабый растворитель для образца) заметно возрастают N или R_s , влияющие на точность или воспроизводимость анализа. Вклад инъекционного объёма в размывание пиков становится более серьёзным в случае колонок с меньшим объёмом или для пиков с малыми значениями k . Для того чтобы поддерживать необходимую эффективность, максимальный введённый объём образца не может превышать мёртвый объём колонки, не вызвав при этом размывания пиков и ухудшения разделения. Чтобы не потерять эффективность, необходимо вводить образец меньшего объёма в колонки с меньшим мёртвым объёмом. Кроме того, более эффективные колонки менее устойчивы к большим объёмам пробы и легче перегружаются. В целом если инъекционный объём составляет не более 25% объёма интересующего пика, то потеря разрешения не должна превышать 5%. Для большинства стандартных колонок подходит объём 25 – 50 мкл пробы, растворённой в подвижной фазе или более слабом растворителе.

Таким образом, чтобы произвести оптимизацию ВЭЖХ системы, необходимо соблюдать следующие общие правила: объём ячейки детектора должен составлять 1/10 объёма пика, инъекционный объём – 1/10 объёма пика. При этом следует стремиться к минимизации длины и диаметра коммуникаций.

Существует три основных способа исключения проблем, связанных с ЭКР. Во-первых, следовать вышеприведённым советам по

оптимизации ВЭЖХ системы. Во-вторых, необходимо работать в той области хроматограммы, где ЭКР минимальны. Наконец, создать такой метод разделения, при котором ЭКР не имели бы большого значения.

Для снижения влияния ЭКР можно оптимизировать фактор удерживания. Увеличение объёма кюветы детектора гораздо более ощутимо для пиков легко удерживаемых компонентов (компонентов с низким k). Это связано с тем, что поздние пики имеют больший объём и, следовательно, меньше подвержены влиянию экстраколоночных эффектов. Данное обстоятельство следует использовать как преимущество, если создать методику разделения, при котором критические пики имели бы k больше 4. В первую очередь, это касается микроколонок, а также колонок с мелким размером частиц сорбента.

С другой стороны, можно подобрать такие условия разделения, при которых экстраколоночные эффекты не будут иметь значения. Имеется в виду такой запас разрешения, при котором значительная потеря разрешения и эффективности, вызванная экстраколоночными эффектами, не снизит точность и воспроизводимость анализа. Часто такой метод называют “надёжным”. Например, если для разделения необходимо добиться разрешения $R_s = 1.25$, то не составит большого труда создать метод с разрешением $R_s = 1.8$. Тем самым будет создан достаточный запас разрешения на случай ЭКР или изнашивания колонки.

8.5. Проблемы изменения селективности колонок

При переходе на новую колонку могут возникнуть нежелательные эффекты ухудшения селективности. Изменения селективности колонки могут быть вызваны изменениями взаимодействия компонентов пробы с химически привитой фазой или силикагелевой матрицей сорбента. Удерживание зависит от длины химически привитых алкильных групп (C_{18} , C_8 и т.д.) и степени покрытия ими матрицы. Также возможны взаимодействия между компонентами пробы и активными силанольными центрами или примесями металлов на поверхности силикагелевой матрицы. Примеси металлов увеличивают кислотность силикагеля, в результате чего остаточ-

ные силанольные группы депротонируются даже при низких значениях pH и сильно взаимодействуют с основными веществами. Незначительные изменения матрицы могут вызвать кардинальные изменения селективности, а также формы пиков, в особенности у основных соединений.

Большие различия значений фактора разделения α ($>10\%$) для двух гидрофобных соединений, например, антрацена и нафталина, указывают на различия привитой фазы. Большие различия селективности для гидрофобного и полярного веществ основной природы (например, толуола и диметиланилина) указывают на различие свойств матрицы сорбента.

Возникновение проблем с селективностью в случае полярных слабоосновных и слабокислых веществ, как правило, вызвано некорректным вводом образца (образец растворен не в подвижной фазе, pH и ионная сила раствора не обеспечивают полного протонирования или депротонирования исследуемых компонентов и т.д.). В некоторых случаях изменение селективности связано с влиянием остаточных активных силанольных групп сорбента. Для его устранения следует установить pH подвижной фазы около 3 или добавить в элюент 10-50 мМ триэтиламина (ТЭА). Это позволит “закрыть” остаточные силанольные группы на поверхности силикагелевой матрицы. Все эти действия значительно улучшат воспроизводимость анализа при смене колонок для таких веществ. Оптимальным же решением в данном случае было бы использование специальных колонок со сверхочищенной силикагелевой матрицей и двойным покрытием функциональными группами (например, колонки Luna C18(2) или C8(2) фирмы Phenomenex), обеспечивающими уникальную воспроизводимость при анализе полярных соединений. Изменения селективности за счёт привитой фазы могут быть устранены при помощи варьирования силы элюента (содержания органического компонента).

8.6. Проблемы воспроизводимости между параллельными вводами пробы

Если время удерживания (T_R) или разрешение (R_s) пиков не воспроизводятся от анализа к анализу и даже ото дня ко дню, то точ-

ность данного ВЭЖХ метода не может считаться удовлетворительной. Плохая воспроизводимость вызвана, как правило, либо изменениями в условиях хроматографирования, либо изменением эффективности колонки (табл.8.12). Проблемы с воспроизводимостью, вызванные изменением эффективности колонки, выражаются обычно изменением удерживания или ухудшением симметрии пика. В табл. 8.13. приведены возможные характерные симптомы причин плохой воспроизводимости анализов, связанных с колоночными изменениями, а также наиболее вероятные и необходимые действия по их предотвращению. Несмотря на то, что приведённая в табл. 8.13 информация относится к хроматографическим системам как изократического, так и градиентного элюирования, при градиентном элюировании есть ряд дополнительных особенностей. Стандартная колонка 250x4.6 мм имеет внутренний объём приблизительно 2.5 мл и требует, по крайней мере, 10-15 объёмов подвижной фазы для достижения состояния равновесия. Это необходимо учитывать при составлении программы градиента. Самая распространённая ошибка заключается в том, что по окончании градиентного элюирования колонку либо забывают смыть сильной фазой, либо после смывки задают недостаточное время для достижения равно-

Таблица 8.12. Причины плохой воспроизводимости

Изменения условий хроматографирования	Изменения эффективности колонки
Изменение подвижной фазы: <ul style="list-style-type: none"> • pH • процент органического модификатора • концентрация буферного раствора • концентрация добавок (ион-парного реагента) • профиль градиента 	Колонка неуравновешенна
	Колонка перегружена
Изменение температуры	Загрязнение колонки
Изменение скорости потока	Потеря привитой фазы

Таблица 8.13. Устранение плохой воспроизводимости по удерживанию

Причины плохой воспроизводимости	Симптомы	Необходимые действия
Колонка неуравновешенна	<ul style="list-style-type: none"> - постоянное увеличение или уменьшение времён удерживания - неправильная форма пика 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Уделяйте больше времени уравниванию колонки. Перед вводом пробы промойте колонку как минимум 15 объёмами подвижной фазы (35 мл для колонки 250 x 4.6 мм). 2. Если для анализа необходим слабый элюент, промойте колонку сначала более сильным растворителем.
Загрязнённая колонка.	<ul style="list-style-type: none"> - продолжительное уменьшение времени удерживания - неправильная форма пика - увеличивающееся давление 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Промойте колонку обратным током сильным растворителем с расходом в 5 раз меньшим по сравнению с рабочим. 2. Если промывка не помогает, замените колонку. В следующий раз используйте предколонку.
Потеря привитой фазы	<ul style="list-style-type: none"> - систематическое изменение (обычно уменьшение) времён удерживания - неправильная форма пика 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Замените колонку, если она больше не удовлетворяет вашим запросам. 2. Используйте специальные колонки, стабильные в широком диапазоне pH.
Перегрузка колонки	<ul style="list-style-type: none"> - уменьшение времени удерживания при увеличении массы введённого образца - "хвостящие" пики 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Разбавьте пробу перед вводом. 2. Подберите колонку с большим внутренним диаметром.

весия, необходимое для начала следующего анализа, либо то и другое наблюдается одновременно.

При недостаточной скорости формирования градиента отдельные компоненты пробы могут накапливаться в колонке, постепенно загрязняя её. Например, если для анализа требуется градиент подвижной фазы с начальным содержанием органического модификатора 10% и конечным – 70%, то для того чтобы смыть с колонки все компоненты пробы, этого может быть недостаточно. Необходимо создать концентрацию 75 – 100%. Если колонка сильно загрязнена, то необходимо сначала промыть её обратным током с расходом в 5 раз меньшим рабочего. Отсоедините колонку от детектора, переверните её и вымойте из неё весь буферный раствор (если таковой использовался) водой. После этого перейдите на 100% органический растворитель. Наиболее приемлемым для этих целей является ацетонитрил, так как в обращённо-фазовой хроматографии он обладает большей элюирующей способностью, чем метанол. Если этого оказалось недостаточно, перейдите на пропан-2-ол, который более эффективно растворяет многие белки, пептиды и жиры и является более сильным растворителем, чем ацетонитрил или даже ТГФ. При этом помните, что вязкость пропан-2-ола значительно выше, чем ацетонитрила и метанола, поэтому расход по сравнению с рабочим должен быть снижен не менее чем в 3-4 раза.

Плохая воспроизводимость параллельных вводов пробы может быть вызвана и плохой воспроизводимостью смешения компонентов ПФ. Данная причина относится исключительно к недостаткам конструкции ВЭЖХ систем. Для ее устранения следует помнить, что в ВЭЖХ системах с формированием градиента на линии высокого давления динамические миксеры обеспечивают значительно более высокую воспроизводимость смешения, чем статические смесители потока. Особенно сильно это проявляется при смешении растворителей сильно отличающихся по вязкости. В системах градиентного элюирования с формированием градиента на линии низкого давления воспроизводимость смешения сильно зависит от степени дегазации компонентов и правильной работы соленоидных клапанов программатора градиента и геометрии камеры смешения.

8.7. Регенерация загрязненных колонок

Технически наиболее удобный метод разделения – изократическая ВЭЖХ. Если при этом подвижная фаза постоянного состава обладает недостаточной элюирующей силой для того, чтобы смыть сильно удерживающиеся (не анализируемые) компоненты пробы с колонки, они накапливаются на сорбенте, и эффективность колонки будет постепенно ухудшаться. Основными симптомами загрязнения колонки являются: увеличение перепада давления, изменение времён удерживания, широкие и “хвостящие” несимметричные пики, потеря разрешения.

Эффективность загрязнённой колонки может быть в большинстве случаев восстановлена путем продолжительной промывки сильным растворителем, например, 100% ацетонитрилом. Если это не помогает, то следуйте инструкциям по регенерации колонок, приведённым ниже.

Регенерация обращённо-фазовых колонок с внутренним диаметром 4.6 мм:

1. Подсоедините колонку к хроматографу в противоположном направлении.
2. Промойте колонку от буферных растворов и солей обратным током 25 мл воды со скоростью 0.2-0.3 мл/мин.
3. Промойте колонку 25 мл пропан-2-ола с расходом 0.2-0.3 мл/мин.
4. Промойте колонку 25 мл метиленхлорида с расходом не более 0.5 мл/мин.
5. Промойте колонку 25 мл гексана с расходом не более 0.5 мл/мин.
6. Промойте колонку ещё раз 25 мл метиленхлорида с расходом не более 0.5 мл/мин.
7. Промойте колонку ещё раз 25 мл пропан-2-ола с расходом 0.2-0.3 мл/мин.
8. Подсоедините колонку в обычном направлении. Промойте колонку подвижной фазой, не содержащей буферный раствор, только после этого добавьте в подвижную фазу буферный раствор с рабочим расходом.
9. Приведите колонку в равновесие 25 – 50 мл подвижной фазы.

10. Введите пробу или стандарт, чтобы убедиться, что колонка регенерирована.

Для колонок меньшего диаметра соблюдайте пропорциональное снижение расходов.

Регенерация нормально-фазовых колонок с внутренним диаметром 4.6 мм:

1. Подсоедините колонку к хроматографу в противоположном направлении.
2. Промойте колонку обратным током 50 мл смеси метанол – хлороформ с расходом 0.2-0.3 мл/мин.
3. Промойте колонку 50 мл этилацетата с расходом 0.5 мл/мин.
4. Подсоедините колонку в обычном направлении.
5. Приведите колонку в равновесие 50 мл подвижной фазы.
6. Введите пробу или стандарт, чтобы убедиться, что колонка регенерирована.

Для колонок меньшего диаметра также соблюдайте пропорциональное снижение расходов. В связи с меньшей вязкостью нормально-фазовых элюентов требования к низкому расходу растворителя менее жестко.

8.8. Уход за колонками и их хранение

Одним из наиболее важных моментов при эксплуатации колонок является уход за ними и их хранение. Правильный уход за колонкой способен значительно продлить срок ее службы. Кроме того, обслуживание колонок не является обременительной задачей.

ПФ выбирают таким образом, чтобы она попадала в рабочий диапазон рН данной колонки. Водородный показатель подвижной фазы определяется только в водном растворе, не смешанном с органическим модификатором. Перед тем, как начать работу на новой колонке, убедитесь в том, что раствор для хранения и транспортировки, в котором она находится, смешивается с рабочей подвижной фазой. Никогда не начинайте работать на обращённо-фазовой колонке, если она находится под 100% органическим растворителем, а Ваша подвижная фаза содержит буферный раствор. Сначала промойте колонку подвижной фазой без буферного раствора, а за-

тем добавьте в неё буферный раствор и приведите колонку в равновесие. В противном случае буферная смесь образует осадок на поверхности сорбента и внутренних стенках колонки.

Никогда не оставляйте колонку на хранение, если она заполнена буферным раствором, чтобы в процессе хранения он не выпал в осадок и не испортил колонку. Буферный раствор может также вызвать рост бактерий и привести тем самым в негодность фриты и сорбент. Это наиболее вероятно при высоком содержании в подвижной фазе буферных растворов. Кроме того, наличие биоорганики может вызвать появление неидентифицируемых пиков на хроматограмме.

Не храните колонку под растворителями, которые легко разлагаются, например, в ТГФ, триэтиламин и трифторуксусной кислоте. В результате распада ТГФ образуются пероксиды, губительные для колонки. Триэтиламин и трифторуксусная кислота могут быть загрязнены примесями, если растворители и колонки хранились не в холодильнике. В случае хранения колонок на короткий период (не более 10 суток) их промывают рабочей подвижной фазой, не содержащей буферный раствор. Так, если подвижная фаза содержала 70% ацетонитрила и 30% буфера, промойте колонку 70% ацетонитрилом. Это предотвратит выпадение осадка и сократит время уравнивания колонки при последующей работе. Для длительного хранения колонку перемывают на тот растворитель, под которым она находилась первоначально. Если рабочая подвижная фаза содержала буферный раствор, то сначала промойте колонку рабочей подвижной фазой, не содержащей буферного раствора, а затем растворителем для длительного хранения. Обращённо-фазовые колонки можно хранить под 100% ацетонитрилом. Если рабочая подвижная фаза содержала буферный раствор, то сначала промойте колонку рабочей подвижной фазой, не содержащей буферный раствор, а затем 100% ацетонитрилом. Кроме того, промывка 100% ацетонитрилом способствует удалению сильно удерживаемых примесей с колонки. Колонки для НФХ после промывки следует хранить в гексане. Для того, чтобы растворитель не испарялся, колонки с обеих сторон закрываются пластиковыми или металлическими заглушками.

ОСНОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И ИСПОЛЗУЕМЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

A – оптическая плотность при i -той аналитической длине волны;
 a_k – весовой коэффициент k -той целевой функции;
 $\log P$ – логарифм коэффициента распределения вещества между октан-1-олом и водой, рассчитанный по специальному алгоритму, запатентованному корпорацией BioByte.
 $E_T(30)$ – сольватохромный параметр Димрота – Райхардта;
 E_T^N – нормализованный параметр Димрота – Райхардта;
 F_k – k -тая целевая функция;
 $F_k^{норм}$ – нормирующее значение для k -той целевой функции;
 $F_{об}$ – значения обобщенной целевой функции для s -той подвижной фазы;
 H – упрощенный критерий гидрофобности Шатца;
 k – фактор удерживания;
 K_S – обобщенный критерий;
 $\log P$ – логарифм коэффициента распределения вещества между н-октанолом и водой;
 M_1 – молекулярная масса разбавителя;
 M_2 – молекулярная масса модификатора;
 m_2 – массовая доля модификатора;
 n – число точек, использованное в статистическом анализе;
 n – показатель преломления растворителя;
 N_2 – мольная доля модификатора;
 P' – параметр полярности Снайдера;
 P^o – рациональный параметр полярности;
 P_N – обобщенный (редуктивный) параметр полярности;
 R – коэффициент корреляции;
 R^2 – степень аппроксимации, коэффициент корреляции в квадрате;
 S – элюирующая способность в обращенно-фазовой хроматографии;
 t_R – время удерживания вещества;
 V_R – объем удерживания вещества;
 $T_{кип}$ – температура кипения;
 $T_{вс}$ – температура вспышки;
 $T_{свп}$ – температура самовоспламенения;
 X_d – способность к протонаакцепторным взаимодействиям;

X_c – способность к протонодонорным взаимодействиям;
 X^n – способность к диполь-дипольным взаимодействиям.
 δ – отклонения свойства бинарной смеси растворителей от аддитивности;
 Δ_j – коэффициент для расчета состава изоэлюотропных смесей;
 δ_T – параметр растворимости Гильдебранда;
 ϵ_{12} – диэлектрическая проницаемость бинарной смеси;
 ϵ^o – элюирующая способность растворителя;
 $\epsilon^o(\text{Al}_2\text{O}_3)$ – элюирующая способность растворителя на оксиде алюминия;
 $\epsilon^o(\text{C})$ – элюирующая способность растворителя на активированном угле;
 $\epsilon^o(\text{C}_{18})$ – элюирующая способность растворителя на силикагеле, модифицированном октадецильными группами;
 $\epsilon^o(\text{SiO}_2)$ – элюирующая способность растворителя на силикагеле;
 ϵ_{12}^o – элюирующая способность бинарной подвижной фазы, ϵ_1^o и ϵ_2^o – элюирующая способность разбавителя и полярного модификатора;
 ϵ_r – диэлектрическая проницаемость;
 η – динамическая вязкость;
 μ – дипольный момент;
 λ – аналитическая длина волны;
 λ^* – предел прозрачности подвижной фазы ($A_i = 1.0$ при $\varphi_i = 1$);
 ρ – плотность растворителя, г/см³;
 φ_1 – объемная доля разбавителя в подвижной фазе;
 φ_2 – объемная доля органического модификатора в подвижной фазе.

ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;
 ДМФА – диметилформамид;
 ДМСО – диметилсульфоксид;
 ЖХ – жидкостная хроматография;
 НФХ – нормально-фазовая хроматография;
 ОФХ – обращенно-фазовая хроматография;
 ПДК – предельно допустимая концентрация;
 ПФ – подвижная фаза;
 РМД – рефрактометрический детектор;
 ТГФ – тетрагидрофуран;
 У.е. – условные единицы
 УФ – ультрафиолетовый

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Цвет М.С. Хлорофиллы в растительном и животном мире. Варшава: Из-во Варшавского университета. 1911. 214 с.
2. Цвет М.С. Хроматографический адсорбционный анализ. Избранные работы. Л.: АН СССР, 1946, 274 с.
3. Tswett M.S. Chromatographic Adsorption Analysis – Selected Works; compilation of Tswett's key papers in English by V.G. Berezkin, E. Horwood, New York, NY, 1990, 112 p.
4. Сенченкова Е.М. Михаил Семенович Цвет. М.: Наука. 1973. 306 с.
5. Сенченкова Е.М. История научного совета по хроматографии РАН. Рождение комиссии по хроматографии. 1945-1953 гг. (к 50-летию распоряжения Правительства от 10 июня 1949 г.) // Теория и практика сорбционных процессов, 1999 г. №25. с.8-20.
6. Шноль С.Э. Герои и злодеи российской науки. М.: КРОН-ПРЕСС. 1997. 464 с.
7. Рихтер А.А., Красносельская Т.А. Роль М.С. Цвета в создании хроматографического адсорбционного анализа // Цвет М.С. Хроматографический адсорбционный анализ. Избранные работы. М., Наука. 1946. С. 215-228.
8. Абелев Г.И. Этика – цемент науки // Химия и жизнь. 1985. № 2. С. 2-8.
9. L.S. Palmer, Carotenoids and Related Pigments, The Chromolipids, Chemical Catalog Co., New York, NY, USA, 1922, 316 p.
10. Chromatography Celebrating Michael Tswett's 125th Birthday, Eds. Kaiser O., Kaiser R.E., Gunz H., Gunther W. Düsseldorf, Germany: Bureau, 1997, 373 p.
11. 75 Years of Chromatography – A Historical Dialogue. Eds. L.S. Ettre and A. Zlatkis, Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 1979, 502 p.
12. Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии/Под ред. А. Хеншен и др. М.: Мир. 1988. 688 с.
13. Шатц В.Д. Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Рига: Зинатне, 1988. 390 с.
14. Бельский Б.Г., Виленчик Л.З. Хроматография полимеров. М.: Химия, 1978. 344 с.
15. New Biochemical Separations Eds. James A.T. and Morris L.J. London, UK: Von Nostrand Co., Ltd., 1964, 424 p.
16. Morris C.J., Morris P. Separation Methods in Biochemistry. Ed. 2., New York, NY, USA: J. Wiley & Sons, 1976, 1045 p.
17. Separation Techniques in Chemistry and Biochemistry. Ed. Keller R.A. New York, NY, USA: M. Dekker, Inc., 1967, 415 p.
18. Heftmann E. Chromatography of Steroids. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 1976, 203 p.
19. Brown P.R. High Pressure Liquid Chromatography: Biochemical and Biomedical Applications. New York, NY, USA: Academic Press, 1973, 202 p.
20. Bush I.E. The Chromatography of Steroids. Oxford, UK: Pergamon Press, 1961, 437 p.
21. Wagman G.H. and Weinstein M.J., Chromatography of Antibiotics. Ed. 2, Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 1984, 504 p.
22. McCaffery A.R. and Wilson I.D. Chromatography and Isolation of Insect Hormones and Pheromones. New York, NY, USA: Plenum Press, 1990, 390 p.
23. Wankat P.C. Rate Controlled Separations. London, UK: Elsevier, 1990, 873 p.
24. Giddings J.C. Unified Separation Science. New York, NY, USA: Wiley-Interscience, 1991, 320 p.
25. Poole C.F. and Poole S.K. Chromatography Today. Ed. 5, Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 1991, 1026 p.
26. Preparative and Process-Scale Chromatography. Ed. Subramanian G. Chichester, UK: E. Horwood, 1991, 286 p.
27. Tsao G.T. Bioseparation. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. V. 47, Berlin: Springer, 1992, 200 p.
28. Tsao G.T. Chromatography. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. V. 49, Berlin: Springer, 1993, 174 p.
29. Hammond E.W. Chromatography for the Analysis of Lipids. Boca Raton, FL, USA: CRC Press 1993, 188 p.
30. Lederer M. Chromatography for Inorganic Chemistry, Chichester, UK: J. Wiley & Sons, 1994, 221 p.
31. Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography. Eds. Guiochon G., Shirazi S.G. and Katti A.M. Boston, MA, USA: Academic Press., 1994, 701 pp.
32. Pharmaceutical and Biomedical Applications of Liquid Chromatography. Eds. Riley C.M., Lough W.J. and Wainer I.M. Oxford, UK: Pergamon Division of Elsevier 1994, 379 p.
33. Highly Selective Separations in Biotechnology. Ed. Street G. London: Blackie, 1994, 231 p.
34. Chromatographic Characterization of Polymers: Hyphenated and Multidimensional Techniques, Advances in Chemistry Series. Eds. Provder T., Barth H.G. and Urban M.D. V. 247, Washington, D.C., USA: American Chemical Society, 1995, 294 p.
35. Scopes R.K. Protein Purification: Principles and Practice. Ed. 3. New York, NY, USA: Springer, 1996, 380 p.
36. Downstream Processing of Natural Products – A Practical Handbook. Ed. Verrall M.S. Chichester, UK: J. Wiley & Sons, 1996, 392 p.

37. The Protein Protocols Handbook. Ed. Walker J.M. Totowa, NJ, USA: Humana Press, 1996, 809 p.
38. *Deyl Z.* Quality Control in Pharmaceutical Analysis – Separation Methods. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 1997, 241 p.
39. *Hostettmann K., Marston A. and Hostettmann M.* Preparative Chromatography Techniques, Applications in Natural Products Isolation. Berlin, Germany: Springer, 1998, 244 p.
40. Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications. Eds. Janson J.C. and Rydén L. New York, NY, USA: Wiley-Liss, 1998, 720 p.
41. *Sadana A.* Bioseparation of Proteins: Unfolding/Folding and Validations, San Diego, CA, USA: Academic Press 1998, 346 p.
42. *Ahuja S.* Handbook of Bioseparations. San Diego, CA, USA: Academic Press, 2000, 650 p.
43. Analytical and Preparative Separation Methods of Biomolecules. Ed. Aboul-Enen H.Y. New York, NY, USA: M. Dekker, Inc., 1999, 462 p.
44. *Dennison C.* A Guide to Protein Isolation. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic, 1999, 186 p.
45. *Ahuja S.* Trace and Ultratrace Analysis of HPLC. New York, NY, USA: Wiley-Interscience, 1992, 419 p.
46. Food Analysis by HPLC. Ed. Nollet L.M. New York, NY, USA: M. Dekker, Inc., 1992, 759 p.
47. *Glockner G.* Gradient HPLC of Copolymers and Chromatographic Cross-Fractionation. Berlin, Germany: Springer, 1991, 210 p.
48. High-Performance Liquid Chromatography in Biotechnology. Ed. W.S. Hancock. New York, NY, USA: J. Wiley & Sons, 1990, 564 p.
49. HPLC of Proteins, Peptides and Polynucleotides: Contemporary Topics and Applications, Ed.. Hearn M. T.W. New York, NY, USA: VCH, 1991, 776 p.
50. HPLC of Peptides and Proteins: Separation, Analysis and Conformation. Eds. Mant C.I., Hodges R.S. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 1991, 938 p.
51. *Сакодынский К.И., Бражников В.В., Волков С.А., Зельвенский В.Ю., Ганкина Э.С., Шату В.Д.* Аналитическая хроматография. М.: Химия, 1993. 464 с.
52. *Киселев А.В., Яшин Я.И.* Адсорбционная газовая и жидкостная хроматография. М: Химия, 1979. 288 с.
53. *Киселев А.В., Пошкус Д.П., Яшин Я.И.* Молекулярные основы адсорбционной хроматографии. М: Химия, 1986. 272 с.
54. *Энгельгардт Х.* Жидкостная хроматография при высоких давлениях. М.: Мир, 1980. 245 с.
55. *Схунмакерс П.* Оптимизация селективности в хроматографии. М.: Мир, 1989. 399 с.

56. *Столяров Б. В., Савинов И. М., Витенберг А.Г.* и др. Практическая газовая и жидкостная хроматография. 1998, СПб.: СПбГУ. 612 с.
57. *Стышкин Е.Л., Ицксон Л.Б., Брауде Е.В.* Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. М.: Химия, 1986. 172 с.
58. Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам. Под ред. О. Микеша (в 2-х томах) М.: Мир, 1982. 783 с.
59. Препаративная жидкостная хроматография. Под ред. Б. Бидлингейера. М.: Мир, 1990. 360 с.
60. Количественный анализ хроматографическими методами /Под ред. Э. Кац. М.: Мир, 1990. 320 с.
61. Жидкостная колоночная хроматография/Под ред. З.Дейла и др. (в 3-х томах). М. Мир. 1978. 1175 с.
62. Chromatography – A Laboratory Handbook of Chromatographic and Electrophoretic Methods. Ed. 3. Ed. Heftmann E. New York, NY, USA: Van Nostrand Reinhold Co 1975, 969 p.
63. *Snyder L.R.* Principles of Adsorption Chromatography, New York, NY, USA: M. Dekker, Inc., 1968, 413 p.
64. *Hellferich F. and Klein G.* Multicomponent Chromatography – Theory of Interference. New York, NY, USA: M. Dekker, Inc., 1970, 419 p.
65. *Karger B.L., Snyder L.R. and Horváth C.* An Introduction to Separation Science. New York, NY, USA: Wiley-Interscience, 1973, 586 p.
66. Chromatographic Analysis of the Environment. Ed. 2. Ed. Grob R.L. (New York, NY, USA: M. Dekker, Inc., 1989, 734 p.
67. *Scott R.P.W.* Contemporary Liquid Chromatography. New York, NY, USA: J. Wiley & Sons, 1976, 326 p.
68. *Simpson C.F.* Practical High Performance Liquid Chromatography. London, UK: The Chemical Society, Heyden, 1979, 315 p.
69. *Hamilton R.J. and Sewell P.A.* Introduction to High Performance Liquid Chromatography. Ed. 2. New York, NY, USA: Chapman & Hall, 1982, 248 p.
70. High-Performance Liquid Chromatography. Ed. Knox J.H. Edinburgh, UK: Edinburgh University Press 1980, 285 p.
71. *Robards K., Haddad P.R. and Jackson P.E.* Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods. London, UK, New York, NY, USA: Academic Press, 1995, 495 p.
72. Process-Scale Liquid Chromatography. Ed. Subramanian G. New York, NY, USA: Wiley-VCH 1995, 225 p.
73. High-Speed Countercurrent Chromatography. Eds. Ito Y. and Conway W.D. New York, NY, USA: J. Wiley & Sons, 1995, 454 p.
74. *Walker J.Q. and Minneci J.* Chromatography Fundamentals, Applications and Troubleshooting. Niles, IL, USA: Preston Publications, 1996, 208 p.

75. Analytical Instrumentation Handbook. Ed. 2. Ed. Ewing G.W. New York, NY, USA: M. Dekker, Inc., 1997, 1450 p.
76. Хроматография. Основные понятия. Терминология. М.: Сборники научно-нормативной терминологии. 1997. вып. 114. 48 с.
77. Nomenclature for Chromatography. Pure and Appl. Chem. 1993. V.65. N4. p. 819.
78. Рудаков О.Б., Селеменев В.Ф. Физико-химические системы сорбат – сорбент – элюент. Воронеж: ВГУ, 2003, 300 с.
79. Sadek P.C., Troubleshooting HPLC Systems: A Bench Manual, New York, NY, USA: J. Wiley & Sons, 2000, 306 p.
80. Особенности эксплуатации ВЭЖХ колонок. Методическое пособие. М.: Аквилон. 2002. 37 с.
81. Boehm R. E., Martire D. E. A unified theory of retention and selectivity in liquid chromatography. I. Liquid-solid (adsorption) chromatography // J. Phys. Chem. 1980. V. 84. N 26. p. 3620-3630.
82. Borowko M., Jaroniec M. Dependence of the distribution coefficient on the mobile phase composition in liquid adsorption chromatography. II. Analytical equations for the distribution coefficient involving non-ideality of the mobile phase and heterogeneity of the adsorbent surface // Chromatographia. 1979. V. 12, N 10. p. 672-678.
83. Jaroniec M., Jaroniec J. A. Theoretical description of association effects in liquid adsorption chromatography with a mixed mobile phase // J. Chromatogr. 1984, V. 295, N 2. p. 377-386.
84. Jaroniec M., Martire D. E. A general model of liquid-solid chromatography with mixed mobile phases involving concurrent adsorption and partition effects // J. Chromatogr. 1986. V. 351, N 1. p. 1—16.
85. Scott R. P. W. The role of molecular interactions in chromatography // J. Chromatogr. 1976. V. 122, N 1. p. 35-53.
86. Scott R.P.W. The silica gel surface and its interactions with solvent and solute in liquid chromatography // J. Chromatogr. Sci. 1980. V. 18. N 7. p. 297-306.
87. Scott R. P. W., Kucera P. Solute interactions with the mobile and stationary phases in liquid-solid chromatography // J. Chromatogr. 1975. V. 112, N 1. p. 425-442.
88. Scott R.P. W., Kucera P. Solute-solvent interactions on the surface of silica gel // J. Chromatogr. 1978. V. 149, N 1. p. 93-110.
89. Scott R. P. W., Kucera P. Solute-solvent interactions on the surface of silica gel, II // J. Chromatogr. 1979. V. 171, N 1. p. 37-48.
90. Snyder L. R. Mobile phase effects in liquid-solid chromatography. Importance of adsorption-site geometry, adsorbate delocalization and hydrogen bonding // J. Chromatogr. 1983. V. 255, N 1. p. 3-26.
91. Snyder L. R., Glajch J. L. Solvent strength of multicomponent mobile phases in liquid-solid chromatography. Binary solvent localization // J. Chromatogr. 1981. V. 214, N 1. p. 1-19.

92. Snyder L. R., Glajch J. L. Solvent strength of multicomponent mobile-phases in liquid-solid chromatography. Further study of different mobile phases and silica as adsorbent // J. Chrom. 1982. V. 248, N 2. p. 165-182.
93. Snyder L. R., Glajch J. L., Kirkland J. J. Theoretical basis for systematic optimization of mobile-phase selectivity in liquid-solid chromatography. Solvent-solute localization effects // J. Chrom. 1981. V. 218, N 1. p. 299-326.
94. Forgács E. and Cserhádi T. Molecular Basis of Chromatographic Separation. Boca Raton, FL, USA: CRC Press 1997, 243 p.
95. Lu P.C., Dai Z.Z. Chromatographic Theory Basis. Beijing, P.R. China: Science Press, 1997, 484 p.
96. Patel D. Liquid Chromatography: Essential Data, Chichester, UK: J. Wiley & Sons, 1997, 146 p.
97. Encyclopedia of Separation Sciences. Ed. Ruthven D.M. New York, NY, USA: J. Wiley & Sons, 1997, 2 Vols., 1707 p.
98. Dyson N. and Smith R.M. Chromatographic Integration Methods. Ed. 2. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 1998, 201 p.
99. Felinger A. Data Analysis and Signal Processing in Chromatography. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 1998, 414 p.
100. Seader J.D. and Henley E.J. Separation Process Principles, New York, NY, USA: J. Wiley & Sons, 1998, 886 p.
101. Thomas W.J. and Crittenden B. Adsorption Technology and Design. Oxford, UK: Butterworth-Heinemann, 1998, 176 p.
102. Meloan C.E. Chemical Separations – Principles, Techniques and Experiments. New York, NY, USA: J. Wiley & Sons, 1999, 752 p.
103. High Resolution Chromatography: A Practical Approach. Ed. Millner P.A., Oxford, UK: Oxford University Press, 1999, 311 p.
104. Encyclopedia of Chromatography. Ed. J. Cazes, New York, NY, USA: M. Dekker, Inc., 2001, 952 p.
105. Szepeszy G. How to Use Reversed-Phase HPLC. New York, NY, USA: VCH Publishers, 1992, 369 p.
106. Bidlingmeyer B.A. Practical HPLC Methodology and Applications. New York, NY, USA: Wiley – Interscience, 1993, 464 p.
107. Practice of High-Performance Liquid Chromatography: Applications, Equipment and Quantitative Analysis. Ed. H. Engelhardt, Berlin, Germany: Springer, 1993, 461 p.
108. Holman R.B., Cross A.J. and Joseph M.H. High-Performance Liquid Chromatography in Neuroscience Research. New York, NY, USA: J. Wiley & Sons, 1993, 369 p.
109. McMaster M.C. HPLC – A Practical User's Guide, New York, NY, USA: VCH, 1994, 211 p.

110. Advances in Liquid Chromatography: 35 Years of Column Liquid Chromatography in Japan. Eds. Hanai T. and Hantano H., NJ, USA: World Scientific, 1996, 338 p.
111. High-Performance Liquid Chromatography: Fundamental Principles and Practice. Eds. Lough W.J. and Wainer I.W. London, UK: Blackie, 1996, 276 p.
112. *Neue U.D.* HPLC Columns: Theory, Technology and Practice, New York, NY, USA: Wiley-VCH, 1997, 416 p.
113. *Snyder L.R., Kirkland J.J., Glajch J.L.* Practical HPLC Method Development. New York, NY, USA: Wiley-Interscience, 1997, 765 p.
114. HPLC: practical and industrial Applications. Ed. Swadesh J. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 1997, 384 p.
115. *Weston A. and Brown P.R.* HPLC and CE: Principles and Practice, San Diego, CA, USA: Academic Press, 1997, 280 p.
116. *Cunico R.L., Gooding K.M. and Wehr T.* Basic HPLC and CE Biomolecules. Richmond, CA, USA: Bay Analytical Laboratory, 1998, 388 p.
117. *Lindsay J. and Lindsay S.* High-Performance Liquid Chromatography. 2nd ed. New York, NY, USA: J. Wiley & Sons, 1998, 337 p.
118. HPLC of Macromolecules: A Practical Approach. 2nd ed. Ed. Oliver R.W.A., Oxford, UK: IRL Press at Oxford University Press, 1998, 204 p.
119. *Pasch H. and Trathnigg B.* HPLC of Polymers. Berlin, Germany: Springer, 1998, 224 p.
120. *Rossomando E.F. and Deyl Z.* HPLC in Enzymatic Analysis – Applications to the Assay of Enzyme Activity. NY, USA: Wiley-Liss, 1998, 480 p.
121. *Meyer V.R.* Praxis der Hochleistungs – Flüssigchromatographie. NY, USA: J. Wiley & Sons, 1998, 352 p.
122. *Lunn G. and Schmuff N.R.* HPLC Methods for Pharmaceutical Analysis. New York, NY, USA; Wiley-Interscience. 4 Vols. 1997 – 2000, 5400 p.
123. Liquid Chromatography. Ed. Dorsey J.G. V. 13. 2000; in R.A. Meyers (Editor-in-Chief) Encyclopedia of Analytical Chemistry. Chichester, UK: J. Wiley & Sons, Ltd., 15 Vols., 2000, 10629 p.
124. Cambridge Soft – Chemical Drawing, Chemical Databases, Enterprise Solutions, Desktop Software, Consulting Services: (<http://www.cambridgesoft.com>)
125. Nomenclature for Chromatography. Pure and Appl. Chem. 1993. V.65. N4. p. 819.
126. *Snyder L. R., Kirkland J. J.* Introduction to modern liquid chromatography. 2nd ed. New York : Wiley- Interscience, 1979. 863 p.
127. *Snyder L. R., Poppe H.* Mechanism of solute retention in liquid-solid chromatography and the role of the mobile phase in affecting separation. Competition versus "sorption" // J. Chrom. 1980. V.184. N 4. p. 363–413.
128. *Soczewinski E.* Solvent composition effects in thin-layer chromatography systems of the type silica gel-electron donor solvent // Anal. Chem. 1969. V. 41, N 1. p. 179-182.

129. *Soczewinski E., Golkiewicz W.* Simple molecular model for adsorption chromatography. VII. Relationship between the R_m value and composition for phenols in systems of the type (cyclohexane+polar solvent)/silica // Chromatographia. 1973. V. 6, N 6. p. 269-272.
130. Современное состояние жидкостной хроматографии. Под ред. Дж. Киркланда. М.: Мир, 1974. 325 с.
131. *Кедик С.А., Фёдоров С.В., Януль Н.А.* и др. Контроль содержания стевииозида в растительном сырье методами ВЭЖХ и ТСХ // Хим-фармжурнал. 2003, т.37, №10, с. 19-22.
132. *Horvath Cs., Melander W., Molnar J.* Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases // J. Chromatogr. 1976. V. 125, N 1. p. 129-156.
133. *Horvath Cs., Melander W., Molnar J.* Liquid chromatography of ionogenic substances with nonpolar stationary phases // Anal. Chem. 1977. V. 49, N 1. p. 142-154.
134. МВИ массовой концентрации сорбиновой и бензойной кислот в напитках методом ВЭЖХ. Свидетельство о метрологической аттестации ВНИИМС № 28-01.
135. *Гордон А., Форд Р.* Спутник химика. Физико-химические свойства, методики, библиография. М.: Мир, 1976. 542 с.
136. *Лурье А.А.* Хроматографические материалы (справочник). М.: Химия, 1978. 440 с.
137. Оборудование, принадлежности и материалы для хроматографии. М.: БиоХимМак СТ. 2003. 36 с.
138. *Фритц Дж., Гьерзе Д. Г., Поланд К.* Ионная хроматография М.: Мир, 1984. 224 с.
139. *Шнигуш О. А., Золотов Ю. Л.* Ионная хроматография – метод быстрого и избирательного определения ионов (обзор)//Заводская лаборатория. 1982, т. 48, № 9, с. 4-14.
140. Ion-exchange Chromatography: Principles and Methods. Pharmacia, 1991, 119 p.
141. *Walton H.F. and Rocklin R.D.* Ion Exchange in Analytical Chemistry. Boca Raton, FL, USA: CRC Press 1990, 229 p.
142. *Smith F.C. and Chang R.C.* The Practice of Ion Chromatography. New York, NY, USA: J.Wiley & Sons., 1983, 218 p.
143. *Slater M.J.* Principles of Ion-Exchange Technology, Oxford, UK: Butterworth Heinemann, 1991, 182 p.
144. *Dubrovski S.A., Ivanov A.E., Kazanskii I.S., Kuznetsova N.P., Saborov V.V., Samsonov G.V. and Zubov V.P.* Polyelectrolytes, Hydrogels and Chromatographic Materials. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1992, 181 p.

145. Weiss J. Ion Chromatography. New York, NY, USA: Wiley-VCH Publications, 1995, 465 p.
146. Fritz J.S., Gjerde D.T. Ion Chemistry. Chichester, UK: J. S., Wiley-VCH, 2000, 254 p.
147. Kunin R. and Myers R.J. Ion-Exchange Resins. 2nd Ed., New York, NY, USA: J. Wiley & Sons, 1958, 466 p.
148. Samuelson O. Ion Exchangers in Analytical Chemistry. Stockholm, Sweden: Almqvist & Wiksell; New York, NY, USA: J. Wiley & Sons; 1963, 474 p.
149. Kitchner J.A. Ion-Exchange Resins. New York, NY, USA: J. Wiley & Sons, 1957, 109 p.
150. Tsyryupa M.P., Maslova I.A., Andreeva A.I., Mrachkovskaya T.A. and Davankov V.A. Reactive Polymers. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 1995, 69 p.
151. Vansant E.F., P. Van Der Voort and Vracken K.C. Characterization and Chemical Modification of the Silica Surface. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 1995, 55 p.
152. Даванков В.А., Навратил Дж., Уолтон Х. Лигандообменная хроматография. М.: Мир, 1989. 294 с.
153. Beesley T. E., Scott R. P. W. Chiral Chromatography. NY: John Wiley & Sons. 1999. 522 p.
154. Highly selective Separations in Biotechnology. G. Street, Ed., London: Blackie Academic and Professional, 1994, 231 p.
155. Quantitative Analysis of Biospecific Interactions. Eds. Lundahl P., Lundquist A. and Greijer E., Newark, NJ, USA: Gordon and Breach Scientific Publishers, 1999, 248 p.
156. Hermanson G. T., Mallia A. K., Smith P.K. Immobilized Affinity Ligand Techniques. Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1992, 454p.
157. High performance liquid Chromatography of Peptides and Proteins: Separation, Analysis and Conformation C.T. Mart and R.S. Hodges, Eds. CRC Press, Boca Raton, FL, 1991, 938 p.
158. Practical Protein Chromatography: Methods in Molecular Biology. Vol. 11. A. Kenney and S. Fowell, Eds. Totowa, NJ: Humana Press 1992, 481 p.
159. Subramanian G. A practical Approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography. New York, NY: VCH Publishers, 1994, 340p.
160. Chromatographic Chiral Separations. Eds. Zief M. and Crane L.J. M. Dekker, Inc., New York, NY, USA; 1988, 410 p.
161. Recent Advances in Chiral Separations. Eds. Stevenson D. and Wilson I.D. New York, NY, USA: Plenum Press, 1990, 230 p.
162. Allenmark S. Chromatographic Enantioseparation – Methods and Applications. 2nd Ed. New York, NY, USA: Ellis Horwood Ltd., 1991, 282 p.
163. Molecular Interactions in Bioseparations. Ed. T.T. Ngo. New York, NY, USA: Plenum Press 1993, 570 p.

164. A Laboratory Guide to Biotin-Labeling in Biomolecules Analysis. Eds. Meier T. and Fahrenholz F. Basel, Switzerland: Birkauer, 1996, 237 p.
165. Chromatographic Separations Based on Molecular Recognition. Ed. Jinno K. New York, NY, USA: Wiley-VCH, 1997, 426 p.
166. Affinity Separations: A Practical Approach. P. Ed. Matejtschuk, Oxford, UK: Oxford University Press, 1997, 253 p.
167. Phillips T.M. and Dickens B.F. Affinity and Immunoaffinity Purification Techniques, Natick, MA, USA: Eaton Publisher, 2000, 366 p.
168. Advances in BioChirality. Eds. Pályi G., Zucchi C. and Caglioti L. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 1999, 416 p.
169. Ahuja S., Chiral Separation by Chromatography. New York, NY, USA: American Chemical Society and Oxford University Press, 2000, 256 p.
170. Chankvetadze B. Chiral Separations. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science, 2000, 500 p.
171. Scouten W.H. Affinity Chromatography: Bioselective Adsorption on Inert Matrices. John Wiley & Sons, New York, NY, 1981, Reprinted by Sigma-Aldrich Corp., 1992, 348 p.
172. Affinity Chromatography: Principles and Methods. Pharmacia, 1993, 143 p.
173. Turková J. Affinity Chromatography. Amsterdam, Netherlands Elsevier: 1978, 405 p.
174. Lowe C.R. An Introduction to Affinity Chromatography (Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 7, Pt. 2). Amsterdam, The Netherlands: North-Holland Publishing Co. 1979, 257 p.
175. Polymer Characterization: Physical Property, Spectroscopic and Chromatographic Methods, Advances in Chemistry Vol. 227, Eds. Carver C.D. and Provder T. Washington, D.C., USA, American Chemical Society: 1990, 512 p.
176. Conway W.D., Countercurrent Chromatography: Apparatus, Theory and Application. New York, NY: VCH Publishers, 1990, 475 p.
177. Gel Filtration: Principles and Methods. Pharmacia, 1991, 102 p.
178. Determan H. Gel Chromatographie, Berlin, BRD: Springer, 1967, 195 p.
179. Yau W.W., Kirkland J.J. and. Bly D.D. Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography, Wiley-Interscience, New York, NY, USA, 1979, 476 p.
180. Size-Exclusion Chromatography. Ed. T. Provder. Washington, DC, USA: American Chemical Society; ACS Symposium Series №138, 1980, 312 p.
181. Нефедов П.П., Лавренко П.Н. Транспортные методы в аналитической химии полимеров. Л.: Химия, 1979. 232 с.
182. Белецкий Б. Г., Мальцев В. Г. Водная высокоэффективная эксклюзионная жидкостная хроматография биополимеров, ее проблемы и перспективы//В кн.: Прикладная хроматография. М., Наука, 1984, с. 54-64.
183. Henke H. Preparative Gel Chromatography on Sephadex LH-20, Heidelberg, BRD: Hüthig. 1995, 617 p.

184. Mori S. and. Barth H.G. Size-Exclusion Chromatography, Heidelberg, DRD, Springer, 1999, 234 p.
185. Column Handbook for Size-Exclusion Chromatography. Ed. Wu C.-S. San Diego, CA, USA: Academic Press, 1999, 637 p.
186. Рудаков О.Б., Родионова Н.С. Практическое применение эксклюзионной хроматографии для анализа смесей олиго-, ди- и моносахаридов комбинированных пищевых продуктов//Теория и практика сорбционных процессов. Воронеж: ВГУ, 1998. Вып. 24. с. 105-106.
187. Рудаков О.Б., Родионова Н.С., Бочарова О.Н. Современное состояние количественного контроля углеводов в пищевых продуктах методами высокоэффективной жидкостной хроматографии (обзор)// Хранение и переработка сельхозсырья. 1999. №2. с. 52-56.
188. Рудаков О.Б., Соколов М.И., Белоглазов В.А., Клиньских А.Ф. Возможности хроматографии молока //Молочная промышленность, 1999, №9, с. 39-40.
189. Рудаков О.Б., Соколов М.И., Болдырев С.Ю., Шестаков А.С. Гель-проникающая хроматография смесей олиго-, ди- и моносахаридов // Известия вузов. Пищевая технология, 1999, вып. 5-6. С. 92-94.
190. Рудаков О.Б., Соколов М.И., Долматова О.И., Полянский К.К. Эксклюзионная хроматография как метод контроля за свежестью молока // Хранение и переработка сельхозсырья. 2001. №3, 50-51.
191. Соколов М.И., Бочарова О.Н., Рудаков О.Б. Молекулярно-массовая характеристика флокулянта на основе полиметилвинилпиридина, кватернизированного бензилхлоридом // Производство и использование эластомеров: ИС.-М.: ЦНИИТЭнефтехим, 1999. № 3 с.14-15.
192. Крусь Г.Н., Шалыгина А.М., Волокитина З.В. Методы исследования молока и молочных продуктов. М.: Колос, 2000, 368 с.
193. Броучек Ф.И., Еристави В.Д. Осадочная и комплекссообразовательно-сорбционная хроматография на модифицированных анионитах. Тбилиси: Изд-во Груз. Политех. Ин-та, 1977. 88 с.
194. Ольшанова К.М. Руководство по ионообменной, распределительной и осадочной хроматографии. М.: Химия, 1965. 224 с.
195. Ольшанова К.М., Копылова В.Д., Морозова Н.М. Осадочная хроматография. М.: Из-во АН СССР. 1963. 104 с.
196. Зельвенский В.Ю., Каминский В.А. Гидродинамическая хроматография //Хроматография. Итоги науки и техники. М.:ВИНИТИ АН СССР. 1984. Т.5. с. 3-31.
197. Giddings J.C. Field-Flow-Fractionation Extending the molecular weight range of Liquid chromatography to one trillion (10^{12}) J. Chromatogr. 1976. V.125 p. 3-16.

198. Giddings J. C., Frank J.Y., Mareks N.M. Theoretical and Experimental Characterization of Field-Flow Fractionation //Anal. Chem . 1976. V. 48 N8. p. 1126 – 1152.
199. Giddings J.C., Myers M.N., Caldwell K.D. . Field – flow fractionation methodological and historical perspectives// Separ. Sci. and Technol. 1981. V.6. p. 549 -575.
200. Myers M.N., Giddings J.C. Properties of the transition from normal to steric field – flow fractionation// Anal. Chem . 1982. V. 54 N13. p. 2284 – 2289.
201. Andreev V.P., Stepanov Y.V., Giddings J.C. Field-flow fractionation with asymmetrical electroosmotic flow. Uncharged particles// J. Microcolumn Separations. 1997. N9. p. 163-168.
202. Andreev V.P., Stepanov Y.V. Field-flow fractionation with asymmetrical electroosmotic flow. Charged particles// J. of Liquid Chromatogr. and Related Techn. 1997.V. 20 p. 2873-2886
203. Andreev V. P., Tikhomolov A. A. Laboratory made instrument for field-flow fractionation in asymmetrical electroosmotic flow//Научное приборостроение. 2000. V.10.N2. p. 88-90.
204. Vindevogel J. and Sandra P.J. Introduction to Micellar-Electrokinetic Chromatography. Heidelberg, Germany: Hüethig, 1992, 231 p.
205. Westermeier R. Electrophoresis in Practice. 2nd Ed. New York, NY, USA: J. Wiley & Sons, 1997, 350 p.
206. Карцева Л.А., Комарова Н.В. Разделение сим-триазинов методом микроэлектродной электрокинетической капиллярной хроматографии с использованием анионного ПАВ/Мат. VIII Всерос. симп. по молекулярной жидкостной хроматографии и капиллярному электрофорезу. М.2001. с. 74.
207. Бельский Б.Г., Курочкин В.Е. ВЭЖХ и родственные методы, 2002 год. /Мат. Всерос. симп. “Современные проблемы хроматографии”. М. 2002. с. 2.
208. Capillary Electrophoresis: Theory and Practice. Eds. Grossman P.D. and Colburn J.C., San Diego, CA, USA: Academic Press 1992, 352 p.
209. Capillary Electrophoresis: Theory and Practice, 2nd Ed. P. Camilleri. Boca Raton, FL: CRC Press, 1998, 552 p.
210. Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, Operation and Applications. Ed.. Altria K.D. Totowa, N.J. :Humana Press., 1996. 349 p.
211. Capillary Electrophoresis in analytical biotechnology. Ed. P.G. Righetti, , Boca Raton, FL: CRC Press 1996, 551 p.
212. Baker D.R. Capillary Electrophoresis. New York, NY: John Wiley & Sons, Inc. 1995, 244 p.
213. Kuhn R., Hoffstetter-Kuhn S. Capillary Electrophoresis: Principles and Practice. Berlin, Germany, Springer-Verlag Inc., 1993, 300 p.

214. *Li S.F.Y* Capillary Electrophoresis: Principles, Practice and Applications, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 1992, 586 p.
215. *Manchenko G.P.* Detection of Enzymes on electrophoretic Gels: A Handbook, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1994, 341 p.
216. Handbook of Capillary Electrophoresis. 2nd Ed., Ed. Landers J.P. Boca Raton, FL: CRC Press, 1997, 912 p.
217. *Беленький Б.Г.* Новые возможности лабораторной аналитики: микрофлюидные чип-анализаторы (лекция)//Клиническая лабораторная диагностика. 2001. №4. с.25-32
218. Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis. Ed. Chankvetadze B. New York, NY, USA: J. Wiley & Sons, 1997, 555 p.
219. *Foret F., Krivanková L. and Bocek P.* Capillary-Zone Electrophoresis. New York, NY, USA: VCH-Weinheim, 1993, 346 p.
220. *Jandik P. and Bonn G.B.* Capillary Electrophoresis of Small Molecules and Ions, , New York, NY, USA: VCH, 1993, 298 p.
221. Capillary Electrophoretic Separation of Drugs. Eds. Cohen A.S., Terabe S. and Deyl Z. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 1996, 362 p.
222. *Engelhardt H., Beck W. and Schmitt T.* Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten. Braunschweig, Germany: Vieweg, 1994, 215 p.
223. High Resolution Separation and Analysis of Biological Macromolecules; Part A – Fundamentals; Part B – Applications; Vols. 270 – 271 Methods in Enzymology. Eds. Karger B.L. and Hancock W.S. , San Diego, CA: Academic Press, 1996, 622 and 555 p.
224. Capillary Electrophoresis Procedures Manual: A Laboratory User's Aid for Quick Starts. Eds. E. Jackim and L.W. Jackim. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 1996, 295 p.
225. *El Rassi Z. and Giese R.W.* Selectivity and Optimization in Capillary Electrophoresis. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 1997, 530 p.
226. Capillary Electrophoresis in the Life Sciences. Ed. Krstulović A.M. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 1997, 293 p.
227. Capillary Electrophoresis in Biotechnology and Environmental Analysis. Eds. Parvez H. et al. Progress in HPLC-HPCE – Vol. 5, Utrecht, The Netherlands: VSP, 1997, 484 p.
228. Handbook of Capillary Electrophoresis Applications. Eds. Shitani H. and Polonsky J. London, UK: Blackie, 1997, 737 p.
229. High-Performance Capillary Electrophoresis: Theory, Techniques and Applications. Ed. Khaledi M.G. New York, NY, USA: J. Wiley & Sons 1998, 1047 p.
230. *Lunn G.,* Capillary-Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis. New York, NY, USA: J. Wiley & Sons 1999, 1900 p.

231. *Krull I.S., Stevenson R.L., Mistry K. and Swartz M.E.* Capillary Electrochromatography and Pressurized Flow Capability Electrophoresis, An Introduction. New York, NY, USA: HNB Publishing 2000, 240 p.
232. Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis. Eds. Peterson J.R and Mohammad A.A. Totawa, NJ, USA: Humana Press 2000, 400 p.
233. CE Innovations 2000. Ed. El Rassi Z. New York, NY, USA J. Wiley & Sons, 2001, 400 p.
234. Современные методы анализа и оборудование в санитарно-гигиенических исследованиях. Под ред. Онищенко Г.Г., Шестопалова Н.В. М.: ФГУП Интерсэн, 1999. с.496.
235. Хроматография. Практическое приложение метода. Под ред. Хефتمان Э. М.: Мир, (в 2-х томах), 1986. 758 с.
236. *Dolan J.W., Snyder L.R.* Troubleshooting LC Systems: A Comprehensive Approach to Troubleshooting LC Equipment and Separations. Humana Press, Clifton, NJ, 1989, 515 p.
237. High performance liquid Chromatography: Principles and Methods in Biotechnology. Ed. Katz E.D. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 1996, 522 p.
238. Введение в микромасштабную высокоэффективную жидкостную хроматографию. Под ред. Д. Исии. М.: Мир, 1991. 240 с.
239. Small Bore Liquid Chromatography Columns. Ed. Scott R. P. W. New York: John. Wiley, 1984. 294 p.
240. Microcolumn High-Performance Liquid Chromatography. P. Kucera Ed., New York: Elsevier, 1984. 302 p.
241. *Беленький Б.Г., Ганкина Э.С., Мальцев В.Г.* Капиллярная жидкостная хроматография. Л.: Наука, 1987, 206 с.
242. *Рудаков О.Б., Алексюк М.П., Коновалов В.В.* Микроколоночная высокоэффективная жидкостная хроматография орто-замещенных производных фенола//Журнал аналитич. химии, 2001, Т.56, №4, с. 351-358
243. *Рудаков О.Б., Селеменев В.Ф., Коновалов В.В., Спитченко О.Н.* Обращенно-фазовая микроколоночная высокоэффективная хроматография фенолов//Журнал физич. химии, 2002, Т.76, №5, с. 931-935
244. *White R.* Chromatography/Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Its Applications. New York, NY, USA: M. Dekker, Inc., 1990, 328 p.
245. *Рубан В.Ф.* История, современное состояние и проблемы развития микро-ВЭЖХ /Мат. Всерос. симп. "Современные проблемы хроматографии". М. 2002. с.3.
246. *Кирхнер Ю.* Тонкослойная хроматография. М.: Мир, 1981. 1139 с.
247. Хроматография в тонких слоях/Под ред. Э. Шталя. М.: Мир, 1965. 508с.
248. *Коренман Я.И.* Практикум по аналитической химии. Хроматографические методы анализа. Воронеж: ВГТА, 2000. 336 с.

249. Высокоэффективная тонкослойная хроматография. Под ред. Златкис А., Кайзер Р.М. М.: Мир, 1979. 245 с.
250. Березкин В.Г., Бочков А.С. Количественная тонкослойная хроматография. М.: Наука, 1980. 183 с.
251. Touchstone J.C. Practice of thin layer chromatography. 3rd ed. New York, NY: John Wiley & Sons, Inc., 1992, 377 p.
252. Гейсс Ф. Основы тонкослойной хроматографии (планарная хроматография). М. (в 2-х томах), 1999. 753 с.
253. Шрайнер Р., Фьюзон Р., Кёртин Д., Морилл Т. Идентификация органических соединений. М.: Мир, 1983. 703 с.
254. Измайлов Н.А., Шрайбер М.С. Капельно-хроматографический метод анализа и его применение в фармацевтике // Фармация, 1938. Т.3. №1. с. 1-7.
255. Block R.J., Strange B. and Zweig G. Paper Chromatography. A Laboratory Manual., New York, NY, USA: Academic Press 1952, 195 p.
256. Cramer F. Papierchromatographie. Weinheim: Verlag Chemie, 1958, 215 p.
257. Papirova Chromatographia. 3rd Ed. Eds. Hais I.M. and Macek K. Prague, Czechoslovak: Czechoslovak Academy of Sciences, 1963, 955 p.
258. Pollard F.H. and McOmie J.F.W. Chromatographic Methods of Inorganic Analysis with Special Reference to Paper Chromatography. Butterworth, UK, 1953, 192 p.
259. Randerath K. Dünnschicht-Chromatographie. Weinheim, Germany: Verlag Chemie, 1962, 285 p.
260. Thin-Layer Chromatography – A Laboratory Handbook. 2nd Ed. Ed. Stahl E. New York, NY, USA: Springer, 1969, 1041 p.
261. Pataki G. Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptid-Chemie. Berlin, Germany: Walter de Gruyter, 1966, 250 p.
262. Pharmaceutical Applications of Thin-Layer and Paper Chromatography. Ed. Macek K. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 1972, 743 p.
263. Thin-Layer Chromatography: Quantitative, Environmental and Clinical Applications. Eds. Touchstone J.C. and Kontes D.R., New York, NY, USA: Wiley-Interscience, 1980, 561 p.
264. Рудаков О.Б., Хрипушин В.В., Селеменев В.Ф., Полянский К.К. Применение типового сканера и программного обеспечения для количественной обработки хроматограмм в планарной хроматографии // Мат. Всерос. симп. "Современные проблемы хроматографии". М. 2002. с.149.
265. Рудаков О.Б., Хрипушин В.В. Количественная обработка данных ТСХ на компьютере с применением типового сканера и программного обеспечения // Мат. XL научн. конф. ВГТА, Воронеж, 2002. Ч.2. с. 268.
266. Рудаков О.Б., Хрипушин В.В. Сафонова Е.Ф., Селеменев В.Ф. Количественная тонкослойная хроматография фосфолипидов // Сорбционные и хроматограф. процессы, 2002, №2, с. 209-212

267. Сумина Е.Г., Штыков С.Н., Тюрина Н.В. Гидрофобная ТСХ фенолкарбоновых кислот трифенилметанового ряда в мицеллах ПАВ / Химия и химическая технология. 2001. Т.44. №4. с. 10-13.
268. Штыков С.Н., Сумина Е.Г. Аналитические возможности мицеллярных подвижных фаз в тонкослойной хроматографии 1,3-дикетоноатов некоторых металлов // Журнал аналитич. химии. 1998. Т.53, №5, с. 508-513.
269. Сумина Е.Г., Ермолаева Е.В., Тюрина Н.В., Штыков С.Н. Применение поверхностно-активных веществ для модификации подвижных и неподвижных фаз при определении пищевых красителей методом ТСХ // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2001. Т.67., №5. с.5-8.
270. Штыков С.Н., Сумина Е.Г., Паршина Е.В., Лопухова С.С. Применение мицеллярных подвижных фаз для разделения производных флуоресцеина методом ТСХ // Журнал аналитич. химии. 1995. Т.50, №7, с.747-751.
271. Штыков С.Н. Поверхностно-активные вещества в анализе. Основные достижения и тенденции развития // Журнал аналитич. химии. 2000. Т.55, №7, с. 679-686.
272. Штыков С.Н. Организованные среды – стратегия, основанная на принципах биоподобия в аналитической химии // Вестник Харьковского нац. университета. 2000. №495. Химия. Вып.6 (29). с. 9-14.
273. Лерри С., Амос Р., Брюер Л. Практическое руководство по жидкостной хроматографии. М.: Мир, 1974. 274 с.
274. Шаршунова М., Шварц В., Михалец Ч. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии. (в 2 томах). М.: Мир, 1980. 621 с.
275. Jork H., Funk W., Fischer W. and. Wimmer H. Thin-layer Chromatography: Reagents and Detection Methods; Physical and Chemical Detection Methods. 3 Vols., Germany: VCH Weinheim, 1990, V. N1, 464 p.
276. Planar Chromatography in the Life Sciences. Ed. J.C. Touchstone, New York, NY, USA: Wiley-Interscience 1990, 199 p.
277. Practical Thin-Layer Chromatography – A Multidisciplinary Approach. Eds. Fried B. and Sherma J. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 1996, 275 p.
278. Wagner W. and Bladt S. Plant Drug Analysis: A Thin-Layer Chromatography Atlas. 2nd Ed. Berlin, Germany: Springer, 1996, 384 p.
279. Hahn-Deinstrop E. Applied Thin-Layer Chromatography: Best Practice and Avoidance of Mistakes, New York, NY, USA J. Wiley & Sons; translated by R.G. Leach, Wiley-VCH, New York, NY, USA, 2000, 304 p.
280. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М.: Мир, 1991. 544 с.

281. The Waters Chromatography Handbook 1993-1994. Milford: Millipore Corp. 1993. 320 p.
282. Chromatography. Alltech Catalog 400. Deerfield: Alltech Corp. 1997. 800 p.
283. Life Science Research Products 96. Bio-Rad. Hercules, California: Bio-Rad Laboratories. 1996. 442 p.
284. Supelco. Chromatography Products for Analysis and Purification. Deisenhofen: Sigma-Aldrich Chemie GmbH. 2001. 607 p.
285. HPLC Columns. Methods and Applications. Bio-Rad. Hercules, California, USA: Bio-Rad Laboratories. 1996. 117 p.
286. Selective Detectors: Environmental, Industrial and Biomedical Applications. Ed. Sievers R.E., New York, NY, USA: J. Wiley & Sons, 1995, 261 p.
287. Unger K.K. Porous Silica, Its Properties and Use as Support in Column Liquid Chromatography. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier 1979, 336 p.
288. Instrumentation for HPLC. Ed. Huber F.K., Amsterdam, The Netherlands: Elsevier 1978, 204 p.
289. Parris N. A. Instrumental Liquid Chromatography: A practical manual on high-performance liquid chromatographic methods. Amsterdam: Elsevier, 1984. 432 p.
290. Coulometric Electrode Array Detectors for HPLC, Progress in HPLC-HCPE. Eds. Acworth I.N. et al. Vol. 6, Utrecht: VSP, 1997, 382 p.
291. LaCourse W.R. Pulsed-Electrochemical Detection in High-Performance Liquid Chromatography., New York, NY, USA: Wiley-Interscience, 1997, 324 p.
292. Melander W.R., Horvath C. // High Performance Liquid Chromatography. Advances and Perspectives. Ed. Horvath C. New York: AP, 1983. V 2. P. 192-226.
293. Detectors for liquid chromatography. Ed. Yeung E.S. New York etc.: Wiley, 1986. 366 p.
294. Selective detectors: Environmental, industrial and biomedical applications. Ed. Sievers R.E. New York etc.: Wiley, 1995. 261 p.
295. Barker J. Mass Spectrometry, J. Wiley & Sons, Chichester, UK, 1999, 509 p.
296. HPLC Detection: Newer Methods, Ed. Patonay G. New York, NY, USA: VCH, 1992, 236 p.
297. A Practical Guide to HPLC Detection. Ed. Parriott D., San Diego, CA, USA: Academic Press, 1993, 293 p.
298. Хубер Л. Применение диодно-матричного детектирования в ВЭЖХ / Пер. с англ. Под ред. В. Г. Березкина. М.: Мир, 1993. 92 с.
299. Scott R.P.W., Liquid Chromatography Detectors. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier 1986, 271 p.
300. Scott R.P.W. Chromatography Detectors. NY: M. Dekker Inc., 1997. 536 p.
301. Detectors for Capillary Chromatography. Eds. Hill H.H. and Mc Minn D.G. New York, NY, USA: J. Wiley & Sons 1992, 444 p.

302. Korhammer S.A., Bernreuther A. Hyphenation of high-performance liquid chromatography (HPLC) and other chromatographic techniques (SFG, GPC, GC, CE) with magnetic resonance (NMR): A review // Fresenius' Journal Analytical Chemistry. 1996. v. 354. №2. p. 131-138.
303. Uden P.C. Element-specific chromatographic detection by atomic absorption, plasma atomic emission and plasma mass spectrometry // J. Chromatogr. A, 1995. V. 703, №1-2. p. 393-416.
304. Uden P.C. // Selective detectors. Environmental, industrial and biochemical applications/ Ed. R.E. Sievers. New York: Wiley. 1995. p. 143-169.
305. Lunn G and Hellwig L.C. Handbook of Derivatization Reactions for HPLC, New York, NY, USA: J. Wiley & Sons, 1998, 1795 p.
306. Lawrence J.F. and Frei R.W. Chemical Derivatization in Liquid Chromatography. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 1976, 213 p.
307. Handbook of Derivatives for Chromatography. 2nd. Eds. Blau K. and Halket J.M. New York, NY, USA: J. Wiley & Sons 1993, 369 p.
308. Modern Derivatization Methods for Separation Science. Ed. T. Toyo'oka. New York, NY, USA: J. Wiley & Sons, 1999, 298 p.
309. Рудаков О.Б., Полянский К.К., Сливкин А.И. Практические аспекты жидкостной хроматографии углеводов // Теория и практика сорбционных процессов. Воронеж: ВГУ. 1999. №25. с. 201-208.
310. Химия. Большой энциклопедический словарь. М.: Большая Российская энциклопедия. 1998. 792 с.
311. Физическая химия. Теоретическое и практическое руководство. Под ред. Б.П. Никольского. Л.: Химия. 1987. 880 с.
312. Глинка Н.Л. Общая химия: Учебное пособие для вузов. Л.: Химия, 1980. 720 с.
313. Краткая химическая энциклопедия: В 5 т. М.: Советская энциклопедия. 1961-1967.
314. Химическая энциклопедия: Т. 1 – 5. М.: Советская энциклопедия, Большая Российская Энциклопедия, 1988-1998.
315. Справочник химика: В 7 т. Т. II: Свойства органических соединений- Л.: Химия, 1971; Т. VI: Важнейшие органические красители; Важнейшие органические лекарственные вещества; Химические средства защиты растений. Л.: Химия, 1968.
316. Свойства органических соединений: Справочник/Под ред. А. А. Потехина. Л.: Химия, 1984.
317. Dictionary of Organic Compounds. 5th Ed./Ed. J. Buckingham et al. Vol 1-7. New York; London; Toronto. 1982; Suppl. 1-4, 1983-1986.
318. Словарь органических соединений: В 3 т./Под ред. И. Хейльброна и Г. М. Бэнбери. М.: Издательство, 1949.

319. Bellsteins Handbuch der organischen Chemie. Bd 1-31. 4 Aufl. Berlin – Göttingen – Heidelberg: Springer, 1918 – (издание продолжается).

320. Рабинович В.А., Хавин З.Я. Краткий химический справочник. Л.: Химия. 1991. 432 с.

321. Рудаков О.Б., Чистовская О.А., Ушкалова М.Л. Высокоэффективная жидкостная хроматография цветообразующих голубых компонентов из ряда производных амидов 1-гидрокси-2-нафтойной кислоты // Журн. аналит. хим. 1995. Т. 50. №3. с.277-282.

322. Рудаков О.Б., Дулуба Л.В., Степанова Г.С., Галаятдинов А.А. ВЭЖХ цветообразующих пурпурных компонентов – производных пиразолона-5 // Журн. аналитич. химии. 1993. Т. 48. №12. С.1934-1940.

323. Рудаков О.Б., Мотина Н.И., Мишкина Л.В., Чистовская О.А., Степанова Г.С. ВЭЖХ цветообразующих компонентов. Желтые компоненты из ряда производных анилидов ароилуксусных кислот и их полупродукты // Журн. аналитич. химии. 1993. Т. 48. № 2. с. 297-304.

324. Рудаков О.Б., Хрипушин В.В., Селеменев В.Ф. Оптимизация условий разделения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии недиффундирующих компонентов фотоматериалов // Журн. аналитич. химии. 1999. Т. 54. № 7. С. 699-705.

325. Рудаков О.Б., Чистовская О.А., Степанова Г.С., Дулуба Л.В., Казанцева Л.В., Степанова Г.С., Гольцев А.Н. Высокоэффективная жидкостная хроматография цветных компонент // Сб. научн. тр. НИИХИМФОТОПРОЕКТ. Органические и неорганические соединения для светочувствительных материалов. М.: НИИХФП. 1993. с. 49-56.

326. Рудаков О.Б., Спитченко О.Н., Болотов В.М. Параметры сорбции фенолов в эквихорических подвижных фазах в условиях микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии // Конденсированные среды и межфазные границы. 2001. Т.3. №4. с. 409-414.

327. Казанцева Л.А., Куплетская Н.Б. Применение УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопии в органической химии. М.: Высшая школа, 1971. 264 с.

328. Левшин Л.В., Салецкий А.М. Оптические методы исследования молекулярных систем. Ч.1. Молекулярная спектроскопия. М.: МГУ, 1994. 320 с.

329. Атлас спектров ароматических и гетероциклических соединений. Вып.1-37. Новосибирск: Наука, Сиб. отд-ние, 1967-88.

330. Коренман И.М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений. М.: Химия. 1975. 360 с.

331. Селеменев В.Ф., Хохлов В.Ю., Бобрешова О.В., Аристов И.В., Котова Д.Л. Физико-химические основы сорбционных и мембранных методов выделения и разделения аминокислот. Воронеж: ВГУ, 2001. 300 с.

332. Болотов В.М. Модифицированные пищевые красители растительного сырья: получение, состав, свойства и области применения. Дисс. ... докт. наук. Воронеж. 2000. 380 с.

333. Филимонов В.Н., Замуруев О.В., Баятинская Л.Н., Колосова И.Ф. Влияние природы модификаторов бинарных подвижных фаз на удерживание синтетических жирорастворимых витаминов силикагелем в условиях ВЭЖХ. Модификаторы I, III и IV групп селективности по классификации Снайтера // Сорбционные и хроматограф. процессы. 2002. Т.2. №1. с. 133-147.

334. Филимонов В.Н., Замуруев О.В., Баятинская Л.Н., Колосова И.Ф. Влияние природы модификаторов бинарных подвижных фаз на удерживание синтетических жирорастворимых витаминов силикагелем в условиях ВЭЖХ. Модификаторы II и V групп селективности по классификации Снайтера // Теория и практика сорбционных процессов. 2000. вып.26. с.73-81.

335. Иоффе Б.В. Рефрактометрические методы химии. Л.: Химия, 1983. 352 с.

336. Kim Y.S., Liu J., Han X.J., Pervin A., Linhardt R.J. Analysis of fluorescently labeled sugars by reversed-phase ion-pairing high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. Sci. 1995. V.33. №4. p. 162-167.

337. Coguet A., Haerdi W., Agosti R., Veuthey J. Determination of sugars by liquid chromatography with post-column catalytic derivatisation and fluorescence detection // Chromatography. 1994. V. 38. №1-2. p. 12-16.

338. Zhu Yan, Zhu Lizhong, Zhuang Xianping. Определение сахара и лимонной кислоты в напитках методом ионной хроматографии // Феньси хуасюэ=Anal.Chem. 1990. V.18. №3. p. 363-265.

339. Sadek P. The HPLC solvent guide. New York: John Wiley & Sons, NY, 1996. 346 p.

340. White D.R., Widmer W.W. Application of high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection to sugars analysis in citrus juices // J. Agr. And Food Chem. 1990. V.38. №10. с. 1918-1921.

341. Frias J., Hedley C.L., Price K.R., Fenwick G.R., Vidal-Valverde C. Improved methods of oligosaccharide analyses for genetic studies of legume seeds // J. Liquid Chromatography. 1994. V. 17. № 11. p. 2469-2483.

342. Jekot J., Biros M., Thayer J. The determination of sugar alcohols using high-performance anion-exchange chromatography and pulsed amperometric detection // Pittsburgh Conf. Anal. Chem. And Appl. Spectrosc. Atlanta, Ga. 1993. p.738.

343. White D.R., Cancalon P.F. Detection of beet sugar adulteration of orange juice by liquid chromatography pulsed amperometric detection with column switching // J. Assoc. Offic. Anal. Chem. Int. 1992. V.75. №3. p. 584-587.
344. Филков Ю.Я. Растворитель как средство управления химическим процессом. Л.: Химия, 1990. 240 с.
345. Райхардт К. Растворители и эффекты среды в органической химии. М.: Мир, 1991. 763 с.
346. High Purity Solvent Guide. 2nd ed. Ed. Przybytek J.N. Muskegon, MI: Burdick and Jackson Laboratories. 1982.
347. Riddick J. A., Bunger W. B. Sakano T. K. Organic Solvents: Physical properties and methods of purification, 4th edn., New York: Wiley-Interscience, 1986.
348. Mellan I., Industrial Solvents Handbook, Noyes Data, New Jersey: Park Ridge, 1977.
349. Manufacturing Chemists Association, Guide for Safety in the Chemical Laboratory, NY: Van Nostrand Reinhold, 1972.
350. Sax N.I., Dangerous Properties of Industrial Materials, 6th edn., New York: Van Nostrand Reinhold, 1984.
351. Safe Use of Solvents, Eds. Callings A. J., Luxon S. G. Orlando: Academic Press, 1982.
352. Захаров Л. Н. Техника безопасности в химических лабораториях Л.: Химия, 1991. 336 с.
353. Sigma. Реактивы для биохимии и исследований в области естественных наук. St. Louis: Sigma Chemical Company, 1999. 2880 p.
354. ICN. Каталог продукции для научных исследований. Costa Mesa, CA: ICN Pharmaceuticals. 1999. 2256 p.
355. Химические реактивы для лабораторных и аналитических работ 2001/2002. Fluka. Ridel-de Haën. Техкэр системс, инк.: М. 2001. 1748 с.
356. Вредные химические вещества. Углеводороды. Галогенпроизводные углеводородов. Справочник. Под ред. Филова В.А. Л.: Химия, 1990. 732 с.
357. Вредные вещества в промышленности. Справочник для химиков, инженеров и врачей. Т. I. Органические вещества/Под ред. Н.В. Лазарева и Э.Н. Левиной. Л.: Химия, 1976. 590 с.
358. Ахадов Я.Ю. Диэлектрические свойства чистых жидкостей. М.: Химия, 1972. 412 с.
359. Ахадов Я.Ю. Диэлектрические свойства бинарных растворов. М.: Химия, 1977. 400 с.
360. Hildebrand J.H., Prausnitz J.M., Scott R.L. Regular and Related Solutions. New York: Van Nostrand Reinhold, 1970. 228 p.
361. Hildebrand J.H., Scott R.L. The Solubility of Nonelectrolytes. New York: Dover, 3rd ed. 1964. 488 p.

362. Скурихин В.Н., Шабеев С.Б. Методы анализа витаминов А, Е, D и каротина в кормах, биологических объектах и продуктах животноводства. М.: Химия. 1996. 96 с.
363. Вайсбергер А., Проскауэр Э., Риддик Дж., Тунс Э. Органические растворители. Физические свойства и методы очистки. М.: Из-во иностранной литературы. 1958. 518 с.
364. Воскресенский П.И. Техника лабораторных работ. М.: Госхимиздат, 1962. 534 с.
365. Рудаков О.Б., Селеменев В. Ф., Рудакова Л.В. Рациональная шкала полярности растворителей для жидкостной хроматографии // Теория и практика сорбционных процессов. Воронеж: ВГУ, 1998. Вып. 23. с. 242-251.
366. Рудаков О.Б., Дулуба Л.В., Степанова Г.С., Галяутдинов А.А. ВЭЖХ цветообразующих пурпурных компонентов – производных 5-пиразолона // Журн. аналитич. химии. 1993. Т. 48. № 12. с. 1934-1940.
367. Рудаков О.Б. Растворитель как средство управления хроматографическим процессом в жидкостной хроматографии. Воронеж: ВГУ, 2003. 300 с.
368. Design and Analysis in Chemical Research. Ed. Roy Tranter. Sheffield Analytical Chemistry. 2000. 576 p.
369. Ахназарова С. Л., Кафаров В.В. Методы оптимизации эксперимента в химической технологии. М.: Высшая школа, 1985. 327 с.
370. Jinno K. A Computer-Assisted Chromatography System, Huethig, Heidelberg, Germany, 1990, 271 p.
371. Handbook of Process Chromatography: A Guide to Optimization, Scale Up and Validation. Eds. G.K. Sofer and L. Hagel. Academic Press, San Diego, CA, USA, 1997, 387 p.
372. Computer-Assisted Method Development for HPLC. Eds. J.L. Glaiach and L.R. Snyder. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1990, 682 p.
373. Lu P.C., Zhang Y.K., Liang X.M. HPLC and its Expert System, Liaoning Press of Science and Technology, Shenyang, P.R. China, 1993, 654 p.
374. Рудаков О.Б., Селеменев В.Ф., Сезин И.М., Аристов И.В., Данилова Е.В. Хемометрический подход в оценке элюирующей способности подвижных фаз в ВЭЖХ Сорбционные и хроматограф. процессы. 2001. Т. 1, № 6, с. 1053-1064.
375. Рудаков О.Б. Применение редуцированного критерия полярности растворителей в жидкостной хроматографии фенолов // Конденсированные среды и межфазные границы, 2002, т.4, №2, с.140-149.
376. Рудаков О.Б. Седихиев И.П. Обобщенный критерий полярности растворителей как средство управления хроматографическим процессом // Известия РАН. Серия химическая, 2003, №1, 52-59.

377. Рудаков О.Б. Диэлектрическая проницаемость двух- и трехкомпонентных подвижных фаз, используемых в высокоэффективной жидкостной хроматографии // Журнал физич. химии. 1997. Т. 71. № 12. с. 2245-2248.

378. Garcia Dominguez J.A., Diez-Masa J.C. Retention parameters in chromatography/ Part A. Hold-up volume concept in column chromatography // Pure Appl. Chem. 2001. V.73. №6. p. 969-992.

379. Prei A., Levin U., Wennrich L., Findeisen M., Efer J. Analysis of nitrophenols and other nitroaromatic compounds in ammunition wastewater by high-field proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) spectroscopy and chromatographic methods // Fresenius J. Anal. Chem. 1997. V. 357. p. 676-683.

380. Prei A., Levsen K., Humpfer E., Spraul M. Application of high-field proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) spectroscopy for the analysis of explosives and related compounds in groundwater samples – a comparison with the high-performance liquid chromatography (HPLC) method // Fresenius J. Anal. Chem. 1996. V. 356. p. 445-451.

381. Hansch C., Leo A. Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology. New York: Wiley, 1979. 352 p.

382. Taft R.W., Abraham M.H., Farni G.M., Doherty R., Abboud J.-L. M., Kamlet M.J. Solubility Properties in Polymers and Biological Media 5: An Analysis of the Physicochemical Properties which Influence Octanol-Water Partition Coefficients of Aliphatic and Aromatic Solutes // J. of Pharmaceutical Sciences. 1985. V.74. N8. p. 807-814.

383. LC Resources Inc.: Innovative resources for chromatography (HPLC and LC-MS): (<http://www.lcresources.com>)

384. Гребенюк В.Д., А.А.Мазо. Обессоливание воды ионитами. М.: Химия. 1980, 256 с.

385. Шапошник В.А., Васильева В.И., Григорчук О.В.. Явления переноса в ионообменных мембранах. М.: МФТИ, 2001, 200 с.

386. Перри Дж. Справочник инженера-химика. Л.: Химия, 1969. Т.1. 640 с.

387. Крестов Г.А., Афанасьев В.Н., Ефремова Л.С. Физико-химические свойства бинарных растворителей: Справ. изд. Л.: Химия, 1988. 688 с.

388. Фиалков Ю. Я. Двойные жидкие системы. Киев: Техніка, 1969. 220 с.

389. Рудаков О.Б., Соколов М.И., Рудакова Л.В. Плотность бинарных подвижных фаз // Журнал физической химии. 1999. Т. 73. №7. с. 1303-1306.

390. Рудаков О. Б., Хрипушин В.В., Бочарова О.Н., Рудакова Л.В. Оптические свойства бинарных подвижных фаз как составляющие целевые функции при оптимизации условий высокоэффективной жидкостной хроматографии гидрофобных соединений фенольного типа / Журн. аналитич. химии. 2001. Т. 56. N 1. с. 44-51

391. Коновалов В.В., Калач А.В., Рудаков О.Б. Оптическая плотность бинарных подвижных фаз для нормально-фазовой жидкостной хроматографии // Теория и практика сорбционных процессов. Воронеж: ВГУ, 2000. Вып. 26. с.244-250.

392. Сольватохромия: Проблемы и методы / Под ред. Бахшиева Н.Г. Л.: ЛГУ, 1989. 320 с.

393. Openheim G. Grushka E. Temperature-dependent refractive index issues using a UV-visible detector in high-performance liquid chromatography // J. of Chromatogr. A, 2002 №942 p. 63-71.

394. Рудаков О. Б., Селеменев В.Ф. Показатель преломления бинарных подвижных фаз для высокоэффективной жидкостной хроматографии // Журн. физич. химии. 1999, Т.73, №12, с. 2242-2245

395. Бретшнайдер С. Свойства газов и жидкостей. Инженерные методы расчета. М.: Химия. 1966. 536 с.

396. Рудаков О. Б., Соколов М.И. Селеменев В.Ф. Вязкость бинарных подвижных фаз для высокоэффективной жидкостной хроматографии // Журн. физич. химии. 1999, Т.73, №9, с. 1641-1644.

397. Эме Ф. Диэлектрические измерения. М.: Химия, 1967. 223 с.

398. Рудаков О.Б., Бочарова О.Н. Температура кипения бинарных подвижных фаз, применяемых для высокоэффективной жидкостной хроматографии // Журнал физической химии. 2000. Т. 74. № 6. с. 1093-1098.

399. Коган В. Б., Фридман В. М., Кафаров В.В. Равновесие между жидкостью и паром. Справочное пособие. М.-Л.: Наука, 1966. Кн. 1, 2. 1426 с.

400. Огородников С. К., Лестева Т.М., Коган Б.В. Азеотропные смеси. Справочник. Л.: Химия, 1971. 848 с.

401. Коган Б.Г. Азеотропная и экстрактивная ректификация. Л.: Химия. 1971. 315 с.

402. Рудаков О.Б. Влияние состава на элюирующую способность бинарных подвижных фаз в нормально-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии // Журнал физич. хим. 2003. т.77. №12. 2230-2235.

403. Bosch E., Rosés M. Relationships between ET Polarity and Composition in Binary Solvent Mixtures // J. Chem. Soc. Faraday Trans., 1992. V. 88. N24. p. 3541-3546.

404. Torres-Lapasio J.R., Garca-Alvarez-Coque M.C., Rosés M., Bosch E. Prediction of the retention in reversed-phase liquid chromatography using solute-mobile phase-stationary phase polarity parameters // J. Chrom. A, 2002, N955. p. 19-34.

405. Bosch E., Bou P., Rosés M. Linear description of solute retention in reversed-phase liquid chromatography by a new mobile phase polarity parameter // Analytica Chimica Acta. 1994, N299. p. 219-229.

406. *Espinosa S., Bosch E., Rosés M.* Retention of ionizable compounds in high-performance liquid chromatography IX. Modelling retention in reversed-phase liquid chromatography as a function of pH and solvent composition with acetonitrile – water mobile phases // *J. Chrom. A*, 2002, N947. p. 47–58.
407. *Калашиников Я.А.* Физическая химия веществ при высоких давлениях. М.: Высшая школа. 1987. 240 с.
408. *Эсбенсен К.* Анализ многомерных данных. Барнаул: АГУ. 2003. 157 с.
409. *Грановский Ю.В.* Успехи и проблемы хеометрии. *Вестник Моск. ун-та. Сер.2, Химия*. 1997. Т.38. №4. С.211–217.
410. *Калач А.В., Коренман Я.И., Нифталиев С.И.* Искусственные нейронные сети – вчера, сегодня, завтра. Воронеж. Изд. ВГУ. 2002 г. 291 с.
411. *Шараф М.А., Иллман Д.Л., Ковальски Б.Р.* Хеометрика. Л.: Химия. 270 с.
412. *Buydens L., Schoenmakers P., Maris F., Hindriks H.* Expert system in chromatography. Results of the ESCA project // *Analytica chim. acta*. 1993. Т. 272. № 1. Р. 41–51.
413. Искусственный интеллект: применение в химии /Под ред. Пирса Т., Хони Б. М.: Мир, 1988. 430 с.
414. *Prus W., Vander Heyden Y., Vankeerberghen P., Kus P., Massart D.L., Kowalska T.* Modelling of solute retention in the reversed-phase high-performance liquid chromatography system with the chemically bonded 3-цианопропил stationary phase // *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 1999. V. 47 p. 253–266.
415. *Wennberg T., Rauha J.P., and Vuorela H.* Computer-Assisted Scale-Up from Analytical HPLC to Preparative MPLC for the Separation of Phenolic Compounds // *Chromatographia*, 2001. V.53 (Suppl.), p. S240–S245.
416. *Molnar I.* Computerized design of separation strategies by reversed-phase liquid chromatography: development of DryLab software // *J. Chromatogr. A*. 2002. V.965, p. 175–194.
417. *Beinert W.-D., Jack R., Eckert V., Galushko S., Tanchuk V. and Shishkina I.* A program for automated HPLC method development // *American Laboratory News*. 2001. V.33, N 15. p. 14–15.
418. *Курицкий Б. Я.* Поиск оптимальных решений средствами Excel 7.0. СПб.: ВHV-Санкт-Петербург, 1997. 384 с.
419. Eluex 3.0: <http://www.compudrug.com/hlpc.html>
420. Merk KGaA-Home: <http://www.ChromSword.com>
421. Xcalibur™ – Универсальное программное обеспечение для масс-спектрометрии: (<http://www.textronica.com/lcline/xcalibur/xcalibur.htm>)
422. ADS – Limathon Ltd, Sheffield, UK – Developers of database solution: (<http://www.limathon.com>)
423. *Рудаков О.Б., Хрипушин В. В., Селеменев В.Ф., Коновалов В.В., Рудакова Л. В., Бочарова О. Н.* Рейтинг растворителей для микроколлонной ВЭЖХ//Теория и практика сорбционных процессов”. Воронеж: ВГУ, 1999. Вып. 24. С. 45–47.
424. *Рудаков О.Б., Хрипушин В. В., Селеменев В.Ф., Бочарова О. Н., Рудакова Л. В., Дроздова Н.В.* Рейтинг растворителей для ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием//Теория и практика сорбционных процессов”. Воронеж: ВГУ, 1998. Вып. 24. С. 82–85.
425. *Рудаков О. Б.* Оценка полярности хроматографических растворителей по обобщенным критериям//Сорбционные и хроматограф. процессы, 2002, Т.2. № 5–6, с. 596–608.

Более шести лет ЗАО "НПКФ АКВИЛОН" разрабатывает и производит приборы и инструменты для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) – одного из самых точных и воспроизводимых методов анализа.

Более 250 ВЭЖХ – систем "Стайер" успешно используются в лабораториях фармацевтической и пищевой промышленности, агрокомплекса, ЦГСЭН, ЦСМ, экологических служб, предприятий тепловой и атомной энергетики, научно-исследовательских центров и университетов.

"Мы создаём системы, ориентированные в первую очередь, на успешное решение рутинных задач повседневной практики лабораторий, уделяя особое внимание надёжности нашего оборудования, а также простоте и удобству его обслуживания."

Приданцев А.А.
Генеральный директор
ЗАО "НПКФ АКВИЛОН"

119421, Москва, ул. Новаторов, 7а, ЦФ РАН, "АКВИЛОН"
Тел./факс: (095) 935-0215, 935-0218, 935-0219, 105-7220
E-mail: aquilon@photonics.ru; chrom@aquilab.ru
www.aquilab.ru