

---

# АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

---



МОСКВА  
"ХИМИЯ"  
1993

Спонсор — итальянская компания  
НЕОЛАБ-ФАЙЗОНС

Авторы:  
К.И. Сакодынский, В.В. Бражников, С.А. Волков,  
В.Ю. Зельвенский, Э.С. Ганкина, В.Д. Шатиц

УДК 543.544.25+513.544.45

Аналитическая хроматография/К.И.Сакодынский, В.В. Бражников, С.А.Волков, В.Ю.Зельвенский, Э.С.Ганкина, В.Д.Шатиц. — М.: Химия, 1993. — 464 с.: ил. ISBN 5-7245-0136-8

В книге изложены основы теории хроматографии, критерии оценки качества разделения, описаны основные узлы хроматографических приборов, в первую очередь детектирующие системы, приведены данные об основных особенностях сорбционных сред, разделительных колонок, включая капиллярные, рекомендации по оптимизации режимов. Представлены данные по свойствам сорбентов, растворителей, сведения по калибровочным коэффициентам. Основное внимание уделено практическим рекомендациям по использованию газовой, жидкостной и тонкослойной хроматографии, по обработке результатов измерений, их метрологической характеристике.

Книга предназначена для работников исследовательских и заводских лабораторий химического, нефтехимического, биологического и медицинского профиля, а также для преподавателей, аспирантов и студентов химико-технологических вузов.

Табл. 52. Ил. 132. Библиогр.: 111 назв.

А  $\frac{1707000000-055}{050(01)-93}$  КБ-49-35-92

ISBN 5-7245-0136-8

© Е.И. Сакодынский, В.В. Бражников,  
С.А. Волков, В.Ю. Зельвенский,  
Э.С. Ганкина, В.Д. Шатиц, 1993

# СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие . . . . .	7
<b>ЧАСТЬ I ОСНОВЫ ХРОМАТОГРАФИИ . . . . .</b>	<b>9</b>
<b>Глава 1. История развития хроматографии . . . . .</b>	<b>10</b>
<b>Глава 2. Хроматографические процессы . . . . .</b>	<b>16</b>
2 1 Классификация хроматографических методов . . . . .	16
2 2 Гидродинамические, сорбционные и диффузионные явления . . . . .	22
2 2 1 Течение газа или жидкости через зернистый слой . . . . .	22
2 2 2 Статика сорбции . . . . .	29
2 2 3 Случайные процессы . . . . .	34
2 2 4 Диффузия . . . . .	40
2 2 5 Кинетика сорбции . . . . .	42
2 3 Закономерности удерживания . . . . .	46
2 3 1 Скорость перемещения компонентов . . . . .	46
2 3 2 Абсолютный объем удерживания . . . . .	49
2 3 3 Относительные характеристики удерживания Индексы удерживания . . . . .	52
2 3 4 Механизм удерживания . . . . .	54
2 3 5 Селективность . . . . .	57
2 4 Размывание хроматографических пиков . . . . .	59
2 4 1 Основные факторы размывания . . . . .	61
2 4 2 Уравнение Ван Деемтера . . . . .	66
2 4 3 Влияние условий разделения на эффективность . . . . .	69
2 4 4 Уравнение Голея . . . . .	73
2 4 5 Уравнение Гиддингса . . . . .	74
2 4 6 Расчет ВЭТТ из хроматограммы . . . . .	76
2 4 7 Теория тарелок . . . . .	77
2 4 8 Влияние объема пробы на эффективность . . . . .	80
2 5 Критерии разделения и их связь с эффективностью и селективностью . . . . .	85
<b>ЧАСТЬ II ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ . . . . .</b>	<b>89</b>
<b>Глава 1. Сорбенты и колонки для газовой хроматографии . . . . .</b>	<b>89</b>
1 1 Адсорбенты . . . . .	90
1 1 1 Минеральные (неорганические) адсорбенты . . . . .	91
1 1 2 Полимерные адсорбенты . . . . .	93
1 2 Носители и неподвижные фазы . . . . .	98
1 2 1 Носители . . . . .	98
1 2 2 Неподвижные фазы . . . . .	102
1 2 3 Привитые неподвижные фазы . . . . .	111
1 2 4 Учет межповерхностной адсорбции в удерживании . . . . .	112
1 3 Подвижная фаза . . . . .	114
1 4 Колонки . . . . .	115
1 4 1 Капиллярные колонки . . . . .	116
1 4 2 Насадочные колонки . . . . .	120
<b>Глава 2. Регулирование газовых потоков . . . . .</b>	<b>123</b>

<b>Глава 3. Ввод пробы</b>	133
3.1. Техника ввода газообразных проб	135
3.2. Техника ввода жидких проб	136
3.3. Техника ввода твердых проб	141
3.4. Техника ввода пробы в капиллярные колонки	142
<b>Глава 4. Детекторы для газовой хроматографии</b>	149
4.1. Неионизационные детекторы	149
4.1.1. Детекторы по теплопроводности (ДТП)	149
4.1.2. Детектор по плотности (ДП)	155
4.1.3. Пламенно-фотометрический детектор (ДПФ)	156
4.2. Ионизационные детекторы	161
4.2.1. Пламенно-ионизационный детектор (ДПИ)	162
4.2.2. Фотоионизационный детектор (ДФИ)	167
4.2.3. Электронозахватный детектор (ДЭЗ)	170
4.2.4. Термоионный детектор (ДТИ)	177
<b>Глава 5. Дополнительные устройства</b>	184
5.1. Схемы обратной продувки и переключения колонок	184
5.2. Пиролитические приставки	188
<b>Глава 6. Хроматографический анализ</b>	192
6.1. Методы подготовки проб для хроматографического анализа	192
6.2. Определение примесей	194
6.2.1. Адсорбционное концентрирование	195
6.2.2. Анализ равновесной паровой фазы	205
6.3. Качественный анализ	214
<b>ЧАСТЬ III. ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ</b>	225
<b>Глава 1. Сорбенты</b>	225
1.1. Сорбенты для ситовой хроматографии	227
1.2. Сорбенты для молекулярной ВЭЖХ	229
1.3. Сорбенты для хемосорбционной хроматографии	235
1.3.1. Сорбенты для ионообменной хроматографии	236
1.3.2. Сорбенты для ионной хроматографии	237
1.4. Специальные сорбенты	238
<b>Глава 2. Колонки для ВЭЖХ</b>	240
2.1. Конструкционные особенности аналитических колонок	241
2.2. Заполнение колонок	246
2.3. Оценка качества колонок для ВЭЖХ	250
<b>Глава 3. Приборы для жидкостной хроматографии</b>	255
3.1. Насосы	255
3.2. Методы измерения расхода элюента	262
3.3. Системы ввода пробы	264
3.4. Блоки контроля температуры	264
3.5. Детекторы	265



3.5.1. Оптические детекторы . . . . .	265
3.5.2. Рефрактометрические детекторы . . . . .	271
3.5.3. Флуориметрические детекторы . . . . .	275
3.5.4. Электрохимические детекторы . . . . .	277
3.5.5. Масс-спектрометры в качестве детекторов . . . . .	280
3.5.6. Детекторы радиоактивности . . . . .	282
3.5.7. Детекторы светового рассеяния . . . . .	283
3.5.8. Газохроматографические детекторы . . . . .	284
3.6. Аналитические жидкостные хроматографы . . . . .	285
3.7. Капиллярные жидкостные хроматографы . . . . .	287
<b>Глава 4. Хроматографический анализ . . . . .</b>	<b>289</b>
4.1. Подвижные фазы . . . . .	289
4.1.1. Элюирующая сила и селективность . . . . .	289
4.1.2. Растворители . . . . .	293
4.1.3. Специфические модификаторы . . . . .	299
4.2. Выбор условий разделения . . . . .	301
4.2.1. Структурные и композиционные факторы, влияющие на хроматографическое удерживание . . . . .	301
4.2.2. Выбор типа хроматографической системы . . . . .	303
4.2.3. Выбор элюирующей силы и селективности подвижной фазы . . . . .	306
4.3. Методические аспекты ВЭЖХ . . . . .	310
4.3.1. Подготовка растворителей . . . . .	310
4.3.2. Подготовка колонок . . . . .	312
4.3.3. Подготовка проб . . . . .	315
4.3.4. Разработка и описание условий анализа . . . . .	318
4.3.5. Качественный анализ . . . . .	324
4.4. Специальные задачи . . . . .	326
4.4.1. Разделение катионов и анионов . . . . .	326
4.4.2. Разделение аминокислот . . . . .	328
4.4.3. Разделение энантиомеров . . . . .	330
4.4.4. Разделение полимеров . . . . .	332
<b>ЧАСТЬ IV. ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ . . . . .</b>	<b>336</b>
<b>Глава 1. Параметры и основные механизмы разделения в ТСХ . . . . .</b>	<b>338</b>
1.1. Параметры ТСХ . . . . .	338
1.2. Основные механизмы разделения в ТСХ и выбор элюента . . . . .	341
1.2.1. Адсорбционная ТСХ . . . . .	342
1.2.2. Распределительная ТСХ (нормальная и обращенно-фазовая) . . . . .	344
<b>Глава 2. Адсорбенты и пластины . . . . .</b>	<b>346</b>
<b>Глава 3. Нанесение пробы. Способы проведения ТСХ . . . . .</b>	<b>352</b>
3.1. Выбор растворителя и способы нанесения пробы . . . . .	352
3.2. Способы проведения ТСХ . . . . .	354
3.2.1. Линейная, круговая и антикруговая ТСХ . . . . .	354
3.2.2. Проточная ТСХ (ПТСХ) . . . . .	357
3.2.3. Многократная ТСХ (МТСХ) . . . . .	358
3.2.4. Двумерная ТСХ (ДТСХ) . . . . .	359
3.2.5. Градиентная ТСХ (ГТСХ) . . . . .	361
3.2.6. ТСХ с принудительным движением элюента . . . . .	362

<b>Глава 4. Способы обработки ТСХ-пластин . . . . .</b>	<b>363</b>
4.1 Обнаружение бесцветных соединений . . . . .	363
4.2. Идентификация . . . . .	367
4.3. Документация . . . . .	368
<b>Глава 5. Количественный ТСХ-анализ . . . . .</b>	<b>368</b>
<b>ЧАСТЬ V. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ . . . . .</b>	<b>374</b>
<b>Глава 1. Методы первичной обработки результатов анализа . . . . .</b>	<b>374</b>
<b>Глава 2. Технические средства количественной обработки хроматографической информации . . . . .</b>	<b>380</b>
2.1. Интеграторы . . . . .	381
2.2. Микро-ЭВМ и персональные компьютеры . . . . .	387
<b>Глава 3. Методы и метрология хроматографических измерений . . . . .</b>	<b>392</b>
3.1. Абсолютная градуировка . . . . .	396
3.2. Метод внутреннего стандарта . . . . .	399
3.3. Метод внутренней нормализации . . . . .	415
3.4. Метрологическая аттестация методик выполнения хроматографических измерений . . . . .	426
3.5. Контроль точности измерений . . . . .	429
<b>Приложения . . . . .</b>	<b>432</b>
<b>Библиографический список . . . . .</b>	<b>441</b>

## ПРЕДИСЛОВИЕ

В последние годы в нашей стране и за рубежом опубликовано большое число монографий и практических пособий по хроматографии, а издательство «Эльзевир» ведет систематическую публикацию книг по различным аспектам хроматографии в рамках серии «Хроматографическая библиотека». Эти книги, написанные одним автором или большими коллективами авторов, посвящены отдельным важным, но относительно узким направлениям самой хроматографии или ее применению в тех или иных областях. Это свидетельствует о том, что в соответствии с проявляющимся спросом хроматографисты стремятся осветить разные аспекты хроматографии и особенности ее применения в различных областях знаний с максимальной подробностью, а обилие материалов действительно создает такую возможность.

Начинающему хроматографисту с трудом удастся отыскать книгу по основам хроматографии и по практике ее применения. Между тем наше приборостроение систематически производит несколько тысяч хроматографов в год, в основном газовых, а сам парк хроматографических приборов в стране с учетом убыли и простоя части приборов можно оценить приблизительно в 25—30 тыс. приборов. По той же же примерной оценке хроматографический парк исследовательских центров и предприятий США оценивается цифрой 200 тыс., причем среди них не менее 25% жидкостных хроматографов. Поэтому каждый год то или иное число специалистов приобщаются к радостям и нередко нелегким заботам пользователей хроматографическими методами и хроматографическими приборами. Особенно велико число таковых в новых, нетрадиционных областях знаний и народного хозяйства.

Хотя большинство хроматографистов-исследователей разошлись по разным направлениям и обмениваются информацией и результатами большей частью на общехроматографических конференциях и симпозиумах, все же достаточно велико число лабораторий и групп, использующих одновременно несколько хроматографических методов.

Наш авторский коллектив хроматографистов, работающих в разных областях хроматографии, объединился для создания книги по практическому использованию хроматографии в одной из наиболее привычных областей — в аналитике. Представление о хроматографии как о преимущественно аналитическом методе преобладает у большинства нехроматографистов и связано с тем, что успех в решении

аналитических задач достигается относительно легко с помощью стандартных приборов.

Авторы пытались дать представление об аналитической хроматографии с использованием ее различных вариантов как о целостной области знаний, с точки зрения единых представлений, которые органически присущи хроматографии во всех ее вариантах.

Авторы книги старались избежать чрезмерного цитирования работ, что обусловлено желанием сократить объем книги. Это вовсе не означает, что в книге использованы только результаты работ самих авторов, большей частью авторы пытались рассмотреть каждый вопрос с учетом максимума опубликованных сведений в данной области. В связи с этим дается достаточно краткий список наиболее интересных книг и обзоров по аналитической хроматографии, среди которых следует отметить работы [1—10].

Авторы будут признательны читателям за замечания по содержанию книги.

В книге К. И. Сакодынским написаны гл. 1 и разд. 2.1 ч. I, гл. 1 (кроме разд. «Колонки») ч. II и гл. 1 и 2 ч. III; С. А. Волковым написаны гл. 2 (кроме разд. 2.1) ч. I, разд. «Колонки» в гл. 1, гл. 5 и разд. 6.2 ч. II; В. В. Бражников является автором гл. 2 и 4 и разд. 6.1 ч. II, гл. 3 ч. III и гл. 1 и 2 ч. V; В. Ю. Зельвенским написаны гл. 3 и разд. 6.3 ч. II, гл. 3 ч. V; В. Д. Шатцем гл. 4 ч. III; Э. С. Ганкиной ч. IV.

## ОСНОВЫ ХРОМАТОГРАФИИ

Сегодня невозможно представить аналитику без хроматографии, и наоборот, во многих отраслях, особенно органической химии, аналитика на 70—80% представлена именно хроматографическими методами. Понятие о том, что такое хроматография, в настоящее время существенно расширилось. Однако в основном справедливо и традиционное понятие о хроматографии, которое гласит: хроматография — физический метод анализа и исследования веществ и их смесей, основанный на разделении компонентов за счет распределения их при перемещении через слой неподвижной фазы потоком подвижной фазы. В основе хроматографических процессов лежат явления сорбции и десорбции, многократное повторение актов которых в этих средах при перемещении через слой неподвижной фазы приводит к разделению компонентов за счет разницы в константах распределения индивидуальных веществ между двумя фазами, перемещающимися друг относительно друга. На разделяемые системы могут накладываться те или иные поля, например электрические, гравитационные или другие, происходить изменения условий во взаимодействующих фазах, что создает большое число возможных вариантов хроматографии. Наиболее важным признаком хроматографии является динамический характер процесса, при котором возникают градиенты в распределении концентраций молекул или частиц.

Наиболее просто следующее определение хроматографии: хроматография — процесс разделения молекул за счет дифференциальной миграции, т. е. разделения за счет различных скоростей перемещения различных молекул.

К числу несомненных достоинств хроматографических методов исследования и анализа относится возможность одновременной реализации большого числа параметров, характеризующих разделение, идентификацию, количественную оценку (измерение) компонентов исследуемой смеси и физико-химические свойства сорбатов и сорбентов. Вследствие этого хроматография является многоканальным источником информации [5]. Выбор сорбентов позволяет регулировать интенсивность распределения пиков по хроматограмме. Важным является возможность осуществить в ходе этих процессов большое число взаимодействий — от чисто физических (ситовые эффекты) до межмолекулярных и хемисорбционных, что позволяет реализовать многообразные механизмы, приводящие к разделению компонентов систем практически любой сложности.

## ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ ХРОМАТОГРАФИИ

Как и всякая научная дисциплина хроматография имеет свою историю. Обычно принято ссылаться на работы 1850 г. немецкого химика Рунге, который описал процесс разделения красителей методом фронтального проявления на бумаге. Найдены и другие работы аналогичного характера. Такого рода фронтальные процессы многократно реализовались в природе при естественной фильтрации водных растворов через породы, а в прошлом имели место в формировании мантии нашей Земли. Опыты Рунге и других ученых были удачной реализацией этих проходящих в естественных условиях процессов, но не составили научной дисциплины.

Основателем хроматографии справедливо считают русского ученого, ботаника и физикохимика Михаила Семеновича Цвета. Несколько слов о его непростой жизни [11]. Родился он 14 мая 1872 г. в небольшом итальянском городе Асти. Его мать, итальянка Мария Де Дороцца, — приемная дочь в семье писателей Жемчужниковых (известных под псевдонимом Кузьма Прутков). Отец — Семен Николаевич Цвет, уроженец Чернигова, видный государственный служащий. Оставшись вскоре после рождения без матери, М. Цвет учился в Швейцарии, где окончил Женевский университет, в котором в 1896 г. получил степень доктора ботаники. Приехав в Россию, он был вынужден заново защищать сначала магистерскую диссертацию (Казанский университет, 1902 г.), а затем и докторскую диссертацию (Варшавский университет, 1910 г.). Значительную часть своей жизни, с 1903 по 1916 г., провел в Варшаве, работая там сначала в университете, а с 1908 г. в Политехническом институте, 1916—1918 годы проведены в Москве, Нижнем Новгороде и Тарту. Умер в Воронеже 26 июня 1919 г. и похоронен на кладбище Алексеевского монастыря, полностью разрушенного в годы второй мировой войны.

Открытие хроматографии относится к периоду завершения М. С. Цветом работы над магистерской диссертацией в Петербурге (1900—1902 гг.) и первого периода работы в Варшавском университете (1902—1903 гг.). Большая часть работы была им сделана в Петербурге в Ботанической лаборатории Академии наук, а в Варшаве проведены завершающие опыты и обдуманы полученные результаты. Его магистерская диссертация посвящена вопросам физико-химического строения хлорофильного зерна и в ней уже есть зачатки хроматографического метода. Но еще в работе 1898 г. [12] он отмечает роль адсорбции и явлений сорбционных равновесий в изучаемых им процессах: «Хлорофиллины не извлекаются из листьев чистым бензином не потому, что они были бы в нем нерастворимы, а потому, что они удержи-

ваются в хлоропластах молекулярными силами. Точно таким же образом удерживаются 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».

В самой же диссертации М. С. Цвет пишет: «... различно окрашенные пояса отчетливо наблюдались мною при фильтрации через шведскую бумагу петролейно-эфирной вытяжки листьев». А в примечании отмечает: «...вместо бумаги можно употреблять полотно или крахмальный порошок». Далее: «В применении к анализу хлорофилла диффузионный метод заслуживал бы разработки и мог бы давать полезные указания, если не служить для количественного разделения веществ». Ниже отмечается: «В моих исследованиях употреблялись обыкновенно углекислая известь или окись магния».

Известно, что М. С. Цвет приехал в Варшаву в ноябре 1902 г., а уже 21 марта (8 марта по старому стилю) 1903 г. он выступает на заседании отделения биологии Общества естествоиспытателей при Варшавском университете с докладом «О новой категории адсорбционных явлений и их применении к биохимическому анализу». Протокол этого заседания сообщает, что во время доклада демонстрировались схемы и произошел обмен мнениями между Д. И. Ивановским, Н. В. Морковиным и докладчиком.

Очевидно, за короткий срок пребывания в Варшаве трудно было бы провести большой объем экспериментов и по существу открыть существенно новый метод. Правоммерно познать, что это было подготовлено предыдущими работами М. С. Цвета. В этом докладе уже есть полное описание особенностей адсорбционного хроматографического метода. Нет пока лишь самого термина «хроматография». С позиций нашей сегодняшней терминологии М. С. Цвет представил доклад по проявительному варианту хроматографии (проявительной жидкостно-адсорбционной хроматографии). Именно этот вариант позволяет реализовать высокую эффективность разделения смесей.

Затем три года молчания, в течение которых М. С. Цвет публикует небольшие статьи по предыдущим исследованиям, выступает с двумя докладами на заседаниях Немецкого общества естествоиспытателей и работает над развитием хроматографиче-

ского метода\*. Наконец, в 1906 г. М. Цвет публикует 2 статьи, в которых детально излагает итоги своих исследований\*\*.

Изучение первых хроматографических работ Цвета позволяет достаточно четко представить себе основные этапы открытия им проявительного варианта хроматографии. Вначале Цвет проводил статические опыты по поглощению пигментов из раствора фильтровальной бумагой. Изменяя растворитель и смещая адсорбционные равновесия, Цвет последовательно переводил вновь в раствор различные пигменты смеси. Затем вместо фильтровальной бумаги он использовал порошок адсорбента. Поскольку порошок надо было фильтровать, М. С. Цвет стал помещать его в воронку с фильтром и постепенно перешел к использованию динамического режима, совместив операции фильтрования и адсорбции, и стал осуществлять разделение сначала по чисто фронтальному варианту. Поскольку в статических опытах Цвет использовал промывание растворителем фильтровальной бумаги с пигментом для отмывки от каротина, ученый после частичного разделения окрашенных слоев стал проводить промывку растворителем в динамических условиях и получил проявительный вариант жидкостной хроматографии, сразу отметив преимущества этого варианта по четкости разделения по сравнению с фронтальным вариантом.

Основные итоги исследований по развитию созданного варианта хроматографии М. С. Цвет изложил в книге «Хромофиллы в растительном и животном мире» (1910 г.) [126], которая является его докторской диссертацией.

Открытие М. С. Цветом хроматографии базировалось, безусловно, на имевшихся достижениях в развитии теории адсорбции, в частности работах Ловица, Фрейндлиха и др. Однако умение М. С. Цвета глубоко анализировать работы других ученых отнюдь не умаляет значимости самого факта открытия. Изучение работ М. С. Цвета показывает, что его заслуга заключается прежде всего в том, что он создал подлинные основы процесса многоступенчатого сорбционного разделения сложных смесей, открыл проявительный вариант хроматографии, существенно развил фронтальный вариант, установил возможность проведения процессов по вытеснительному варианту, связал вместе все варианты хроматографии единым общим подходом. Исключительно интересны представления М. С. Цвета о физическом

---

\* От греческих слов: «хромо» — цвет, «графо» — пишу. В связи с этим профессор Оксфордского университета Ховард Парнелл заметил: «Приятно думать, что Цвет, имя которого по-русски как раз и означает цвет (окраску), в связи с этим удобным случаем позволил себе удовольствие проявить свое чувство юмора».

\*\* К сожалению, в ряде работ зарубежных ученых открытие хроматографии датируется 1906 годом, когда были опубликованы эти работы М. С. Цвета на немецком языке.



характере адсорбции при хроматографическом разделении, об условиях, обеспечивающих высокую скорость установления адсорбционного равновесия, о расположении веществ в адсорбционных рядах и соответственно о закономерном порядке расположения их по длине колонны или выхода из колонны. Он отметил возможности адсорбции веществ на поверхности, уже насыщенной другими адсорбированными веществами, и впервые четко показал сложный характер взаимодействий в системе сорбат — сорбент — растворитель (понятие о сложности процессов в сорбционной среде). Наряду с этим он высказал мысль о необходимости использования в ряде случаев окислительно-восстановительных реакций и реакций гидролиза на поверхности адсорбентов и проведения химических реакций с веществами для облегчения разделения их в виде производных (реакционная хроматография). М. С. Цвет подробно изучил 126 адсорбентов, впервые провел модификацию адсорбентов нагреванием. Он исследовал и сорбционные свойства воды, в какой-то мере отметив этим возможность использования распределительной хроматографии. Ученый пропускал в колонну и газ (воздух и метан), правда, лишь для удаления растворителя.

М. С. 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 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.

М. С. 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 процессов и чисто диффузионных явлений. Разделение веществ он осуществлял как по методу частичного, так и полного вымывания их из колонки.

Ученый высказал мнение о необходимости подвергать хро-

---

\* Лучшие из полученных им самим колонок при длине 50 мм имели эффективность порядка 2 тыс теоретических тарелок

матографическому анализу все пигменты для установления их состава — степени чистоты. Наряду с разработкой основ метода и его широким использованием для решения сложных даже по нынешнему уровню развития задач он ввел многие основные понятия и термины нового метода, включая название метода «хроматография»: «проявление», «вытеснение», «хроматограмма» и др.

Своими работами М. С. Цвет существенно углубил и расширил те адсорбционные методы, которые были известны до него. В частности, нынешнее широкое развитие хроматографии на бумаге является в значительной мере следствием распространения открытых М. С. Цветом общих закономерностей на случай адсорбционного разделения смеси на полосках бумаги. Он в какой-то мере предвосхитил и появление хроматографии в тонком слое, отметив аналогию свойств полоски и слоя карбоната кальция, применяемого для хроматографирования растворов.

Подробный анализ того, что было сделано М. С. Цветом в области хроматографии, позволяет полностью согласиться с Цейхмайстером, который писал: «Именно М. Цвет является истинным изобретателем хроматографии во всех ее основных аспектах».

Хроматографию сначала использовали очень редко, она появилась слишком рано. Как справедливо отметил Цейхмайстер, хорошо известно, что значение выдающихся открытий далеко не всегда осознается сразу. Во многих случаях дальнейшее развитие начинается только после значительного промежутка времени. Протяженность такого скрытого периода является как бы мерой того, насколько человек, сделавший открытие, опередил своих современников. Скрытый период хроматографии длился около 20 лет, причем в течение этого промежутка времени появилось лишь очень небольшое число сообщений о различных применениях метода.

Просмотр старых исследований нередко приводит к находкам работ, содержащих зачатки хроматографической техники. Однако в большинстве случаев речь идет о проведении адсорбционного разделения по простейшим вариантам фронтального анализа. Несмотря на их безусловную ценность, полезность и интерес, ни одно из них не смогло развиваться в ту хроматографию, которой мы сегодня пользуемся столь широко и которая, как было показано выше, на основе даже простого перечисления того, что сделал М. Цвет, базируется именно на его работах.

Скрытый период развития хроматографии окончился в 1931 г., после того, как Э. Ледерер, прочитав сделанный Вильштетером рукописный перевод книги М. С. Цвета на немецкий язык, провел хроматографическое разделение каротинов. С тех пор хроматографию начали широко использовать в ботанических и биохимических лабораториях [8].

Важным этапом стало открытие Н. А. Измайловым и М. С. Шрайбер метода хроматографии в тонком слое в 1938 г. в Харьковском химико-фармацевтическом институте. Далее существенным в развитии хроматографии стало открытие Мартином и Сингом в 1940 г. варианта жидкостной распределительной хроматографии на примере разделения ацетильных производных аминокислот на колонке, заполненной силикагелем, насыщенным водой, с использованием хлороформа в качестве растворителя. Тогда же было отмечено, что в качестве подвижной фазы может быть использована не только жидкость, но и газ. Далее эти ученые предложили осуществлять разделение производных аминокислот на смоченной водой бумаге с бутанолом в качестве подвижной фазы. Они же осуществили первую двумерную систему разделения.

За открытие распределительного варианта хроматографии Мартин и Синг в 1952 г. получили Нобелевскую премию. В 1952—53 гг. Мартин и Джеймс осуществили вариант газовой распределительной хроматографии, разделив смеси на смешанном сорбенте из силикона ДС-550 и стеариновой кислоты. С этого времени наиболее интенсивное развитие получил метод газовой хроматографии. Метод привлекал внимание своей экспрессностью и простотой и быстро завоевал признание исследователей. После этого развитием хроматографических методов разделения и анализа занялась большая группа талантливых ученых и инженеров, которые развили теорию метода, создали постепенно усложнявшиеся приборы, нашли оригинальные и часто остроумные приемы и комбинации хроматографических вариантов, колонок, детекторов, систем включения и переключения колонок и детекторов. Стали регулярно проводиться хроматографические конференции и симпозиумы, первый из которых состоялся в 1956 г. в Лондоне. Хроматография стала не только интересным полем реализации творческих замыслов, но и весьма полезным аналитическим методом. Часть блестящих ученых занимались развитием самого метода, другие — его применением. Например, Сиборг осуществил разделение нескольких десятков атомов трансурановых элементов. Исключительное значение имело создание в 1956 г. Голеем капиллярного варианта хроматографии, а в 1962 г. Порат и Флодин создали вариант ситовой хроматографии и применили его для разделения высокомолекулярных соединений. С середины 70-х годов начинается период интенсивного развития жидкостной хроматографии, с середины 80-х годов практическое использование флюидной хроматографии и полная компьютеризация всего хроматографического процесса.

Становление хроматографии в СССР связано с именами А. А. Жуховицкого, А. В. Киселева, К. А. Гольберта, Д. А. Выхирева, К. В. Чмутова, К. М. Салдадзе, В. В. Рачинского и др. Интересно отметить, что первый советский газовый хроматограф

ХТ-2М был создан чуть позже соответствующих зарубежных приборов. Ряд оригинальных работ был выполнен в области теории хроматографии и создания ее новых вариантов, включая теорию межмолекулярных взаимодействий в хроматографической среде, вакантной хроматографии, без газа-носителя, теплодинамической, циркуляционной, вакуумной, микроколоночной, лигандообменной, корреляционной термохроматографии и др. Большое значение для практического использования в начальный период имели методические работы М. И. Дементьевой, Н. И. Луловой и др. Для развития хроматографического приборостроения много сделали Я. А. Гуревич, А. А. Дацкевич и З. М. Шапиро. Интенсивное развитие работ в немалой степени было связано с активной деятельностью Научного совета по хроматографии АН СССР (первый председатель член-корреспондент АН СССР Чмутов К. В.) [12].

Конечно, для развития хроматографии у нас в стране имело немаловажное значение появление большого числа энтузиастов этого метода среди молодых тогда исследователей и инженеров. К сожалению, в последующем, несмотря на отдельные достижения в области теории хроматографии и создания новых вариантов и комбинаций хроматографических методов, постепенно усугубилось наше отставание от передовых зарубежных стран и в области хроматографии. В первую очередь это относится к хроматографической технике, использованию микропроцессоров и компьютеров, высокоэффективных колонок и биохимическому и медицинскому применению жидкостной хроматографии. Тем не менее хроматография в нашей стране на фоне других аналитических методов относится к числу благополучных областей по уровню используемых приборов, количеству проводимых анализов и активности работающих в этой области исследователей, инженеров и аналитиков.

## *Глава 2*

# **ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ**

## **2.1. КЛАССИФИКАЦИЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ**

Хроматография, обязательно включающая процесс разделения смесей веществ в динамическом режиме, охватывает не только достаточно обширный раздел аналитической химии, но и лежит в основе ряда технологических процессов. В связи с этим хроматография включает два основных направления: информационное и технологическое. Первое обеспечивает информацию о качественном и количественном составе и физико-химических свойствах исследуемых объектов, второе — получение материальных продуктов.

Как способ анализа хроматография является частью той группы методов, которая ввиду сложности исследуемых объектов включает предварительное разделение исходной сложной смеси на относительно простые, например, дистилляцией, зонной плавкой, экстракцией, диффузией или комбинацией этих методов. Среди них хроматографические методы обладают наиболее эффективными разделительными возможностями за счет использования большого числа типов межмолекулярных взаимодействий. Стадия разделения в хроматографической колонке или слое сорбента обеспечивает получение относительно простых (в идеальном случае бинарных) смесей, анализируемых затем обычными химическим, физико-химическим или физическим методами анализа или специально созданными для хроматографии методами или приемами.

Разнообразные варианты хроматографии [1—4] укладываются в относительно простую схему классификации в зависимости от используемой подвижной фазы и характера межмолекулярных взаимодействий. Поскольку характер взаимодействий может быть очень различным: от чисто ситового эффекта к физической сорбции и далее к хемосорбции (ионный обмен, аффинная хроматография), то почти не существует объектов, для разделения которых не удавалось бы найти подходящего сорбента и систем растворителей. Области применения основных вариантов хроматографии в зависимости от молекулярной массы исследуемых соединений показаны на рис. 1.1.

Оценивая место хроматографии среди аналитических методов, следует отметить, что в области молекулярного анализа органических соединений хроматография преобладает над другими методами разделения, не заменяя их. Об этом свидетельствуют

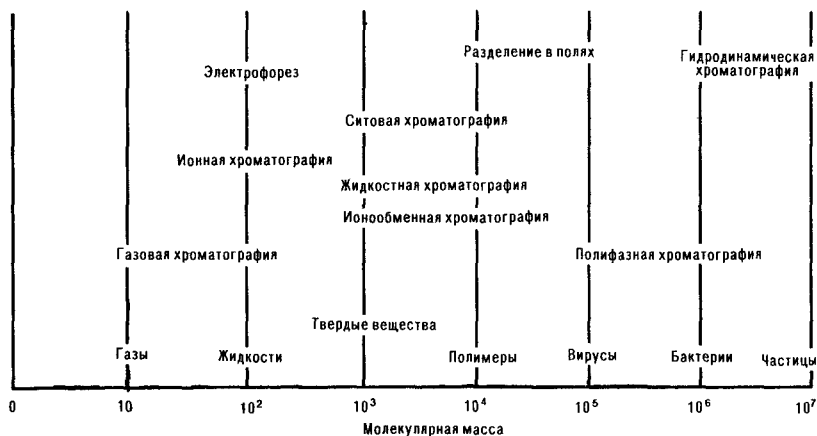


Рис. 1.1. Области применения основных вариантов хроматографии в зависимости от молекулярной массы исследуемого соединения

данные проведенного в США опроса об использовании различных аналитических приборов примерно в 3000 исследовательских центрах и о намечаемом приобретении ими различного типа приборов в ближайшие годы (табл. 1.1.). Как следует из данных табл. 1.1, хроматографические приборы занимают одно из первых мест как по степени использования, так и по росту потребности в них.

Классификация вариантов хроматографии приведена в табл. 1.2 и на рис. 1.2. Следует иметь в виду, что в аналитической практике преобладает использование варианта проявительной хроматографии, когда подвижная фаза подается в хроматографическое устройство непрерывно, а разделяемая проба — периодически.

*Таблица 1.1 Относительная распространенность различных аналитических приборов в исследовательских центрах США*

Тип прибора	Доля центров, использующих соответствующий тип прибора, %	Доля центров, желающих приобрести приборы данного типа, %
Газовые хроматографы	52,5	24,0
Спектрофотометры.		
видимой области	50,4	7,8
УФ-области	47,9	9,5
ИК-области	42,5	13,0
Жидкостные хроматографы	32,8	42,8
Ионоселективные электроды	32,0	14,0
Атомно-абсорбционные спектрофотометры	29,4	15,4
Хроматографы в тонком слое	27,2	9,8
Титраторы автоматические	19,2	25,2
Флуоресцентные спектрофотометры	16,6	16,4
Масс-спектрометры	16,5	19,0
Газоанализаторы на кислород	15,8	17,0
Анализаторы элементного состава	15,2	14,5
Влагомеры	13,8	26,6
Рентгеновские спектрометры	13,5	18,7
ЯМР-спектрометры	13,3	20,0
Хромато-масс-спектрометры	12,2	37,6
Полярографы	9,0	21,1

*Таблица 1.2. Варианты хроматографии по фазовым состояниям*

Подвижная фаза	Неподвижная фаза	Название варианта	
		частное	общее
Газ	Адсорбент	Газоадсорбционная	Газовая хроматография
Жидкость	Жидкость	Газожидкостная	Жидкостная хроматография
	Адсорбент	Жидкостно-адсорбционная	
	Жидкость	Жидкостно-жидкостная	

Подвижная фаза	Неподвижная фаза	Название варианта	
		частное	общее
Газ или пар в сверхкритическом состоянии	Адсорбент	Флюидно-адсорбционная	Флюидная хроматография
Коллоидная система	Жидкость	Флюидно-жидкостная	Полифазная хроматография
	Сложная композиция твердых и жидких компонентов		

При всем разнообразии вариантов хроматографии практически всегда реализуется общая схема процесса, представленная

Механизм процесса разделения	Схема	Название варианта
По размеру молекул		Ситовая хроматография
За счет физической адсорбции или растворения		Молекулярная хроматография
За счет ионного обмена		Ионообменная хроматография
За счет водородной связи, химического сродства и др.		Хемосорбционная хроматография

Характер процесса	Схема	Название варианта
В цилиндрическом слое сорбента		Колоночная хроматография
В слое сорбента на плоской поверхности		Планарная хроматография
В пленке жидкости или слое сорбента, размешанном на внутренней стенке трубки		Капиллярная хроматография
В полях электрических, магнитных, центробежных и других сил		Хроматография в полях сил

Рис. 1.2. Варианты хроматографии по характеру взаимодействий (а) и по способу проведения (б)



Рис. 1.3. Схема реализации хроматографического процесса с целью анализа смесей

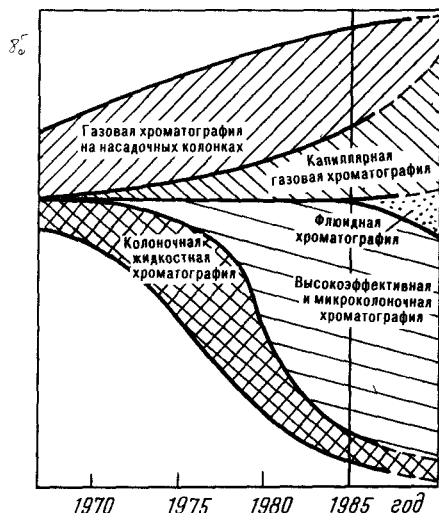


Рис. 1.4. Относительная распространенность различных вариантов хроматографии

на рис. 1.3. Подвижная фаза (газ-носитель или жидкость) непрерывно пропускается через слой гранулированного сорбента, засыпанного в колонку. В этот поток дозирующим устройством вводится импульсно анализируемая смесь, которая должна быть газообразной или испаряться в дозаторе в случае газовой хроматографии, или растворяться в подвижной фазе в случае жидкостной. Перемещаясь потоком подвижной фазы по колонке, анализируемая смесь разделяется на составляющие ее компоненты: компоненты, сорбирующиеся хуже на данном сорбенте, двигаются быстрее и вымываются из колонки раньше, чем сорбирующиеся лучше. Расположенный после колонки детектор фиксирует наличие в потоке компонентов; его сигнал, обычно пропорциональный концентрации или количеству компонента, записывается на самопишущем потенциометре (регистраторе) в виде хроматограммы — графика зависимости концентрации (количества от времени). Хроматограмма при полном разделении компонентов состоит из системы колоколообразных кривых, называемых пиками: каждый пик относится к одному или нескольким компонентам и соответствует возрастанию, а затем снижению концентрации в потоке подвижной фазы.

Кроме рассмотренной колоночной, имеются различные варианты так называемой планарной хроматографии, при которых слой сорбента создается не в колонке, а на плоской поверх-



*Таблица 1.3. Распределение публикаций по отдельным видам хроматографии*

Вариант хроматографии	Относительное число публикаций, %	
	1983—1985 гг	1987 г
Жидкостная:		
колоночная	50	56
планарная	16	7
Сверхкритическая флюидная	2	4
Газовая	32	33

ности, например, как в тонкослойной или бумажной хроматографии. Что касается относительной распространенности различных хроматографических методов, то определенное представление об этом дают данные наукометрического анализа развития современной хроматографии В. Г. Березкина и других [6], приведенные в табл. 1.3, а также данные других исследователей, показанные в графической форме на рис. 1.4.

Существующее мнение о том, что газовая хроматография уступает свои позиции жидкостной хроматографии, переживающей период технического ренессанса, верно лишь отчасти. Область использования газовой хроматографии — соединения с молекулярной массой порядка до 500, которые составляют ~5% от общего числа известных соединений. Соединения с большей молекулярной массой — сфера приложения жидкостной хроматографии — составляют 95% всех известных химических веществ. Вместе с тем не следует забывать, что упомянутые 5% более простых веществ — объектов газовой хроматографии сегодня, да и в ближайшем будущем, — составляют 70—80% соединений, которые использует человек в сфере производства и быта. Поэтому развитие жидкостной хроматографии [7—8], успехи которой неоспоримы, не теснит позиций газовой хроматографии, а расширяет области применения хроматографии, включая в качестве изучаемых объектов все более и более сложные системы, столь важные в первую очередь для биохимии. Само противопоставление разных аналитических методов, в том числе и хроматографических, лишено смысла. Жизнь ставит перед аналитической химией различные новые и все более сложные задачи, для решения которых должны быть найдены соответствующие методы. Поэтому тот метод хорош, который позволяет решить ту или иную задачу с нужной точностью (достоверностью), экспрессностью и минимальными затратами.

## 2.2. ГИДРОДИНАМИЧЕСКИЕ, СОРБЦИОННЫЕ И ДИФфуЗИОННЫЕ ЯВЛЕНИЯ

В основе хроматографических процессов лежат разнообразные гидродинамические, сорбционные и диффузионные явления, изучаемые в различных разделах физической химии. Прежде чем приступить к изложению закономерностей хроматографического разделения, приведем основные сведения об этих явлениях применительно к особенностям их протекания в хроматографических системах.

### 2.2.1. Течение газа или жидкости через зернистый слой

Хроматографическая колонка представляет собой в большинстве случаев трубку, заполненную зернами сорбента неправильной или сферической формы. Такую систему называют в гидроаэродинамике неподвижным или стационарным зернистым слоем [13]. Через зернистый слой в процессе хроматографического разделения непрерывно фильтруется поток подвижной фазы — жидкости или газа.

Основной характеристикой этого течения является объемная скорость или расход  $W$ , который измеряют непосредственно на выходе колонки. Если разделить расход, выражаемый обычно в  $\text{см}^3/\text{мин}$  или  $\text{см}^3/\text{с}$ , на сечение колонки  $S_{\text{кол}}$ , то получим величину, выражаемую в  $\text{см}/\text{мин}$  или  $\text{см}/\text{с}$ , которую называют фиктивной скоростью. Мы будем обозначать ее буквой  $w$ . Поскольку фиктивную скорость измерить наиболее просто, ее часто используют при описании условий хроматографического разделения, снятии различных зависимостей и т. д. Хотя формально ее размерность совпадает с размерностью линейной скорости, следует, конечно, иметь в виду, что на самом деле это расход подвижной фазы, отнесенный к единице площади сечения колонки. Если мы сделаем разрез колонки, то увидим, что часть сечения непроницаема для течения подвижной фазы, а часть занята каналами и заполнена подвижной фазой. Детальная картина течения в сложной системе сообщающихся между собой каналов неправильной формы и различных размеров чрезвычайно сложна. Ясно, что истинная скорость потока меняется при переходе от одной точки сечения к другой, меняется она и по длине каналов. Можно, однако, ввести некоторые средние характеристики зернистого слоя и установить среднюю линейную скорость потока.

Важнейшей характеристикой зернистого слоя является его порозность  $\varepsilon$  — доля сечения, занятая подвижной фазой:

$$\varepsilon = S_0/S_{\text{кол}},$$

где  $S_{\text{кол}} = \pi d_{\text{кол}}^2/4$ ,  $d_{\text{кол}}$  — диаметр колонки;  $S_0$  — площадь сечения, занятая подвижной фазой.

Если умножить числитель и знаменатель этого отношения на длину колонки  $L$ , то получим

$$\varepsilon = V_0/V_{\text{кол}},$$

где  $V_{\text{кол}}$  — объем всей колонки;  $V_0$  — объем в колонке, занятый подвижной фазой.

Таким образом, порозность — это доля сечения или объема колонки, занятая подвижной фазой. В дальнейшем  $S_0$  и  $V_0$  будем называть свободным сечением и свободным объемом. Зная  $\varepsilon$ , можно легко определить среднюю истинную скорость потока  $u$ , т. е. ту среднюю скорость, которую мы получили бы, поместив прибор для измерения скорости потока непосредственно в каналы, занятые подвижной фазой. Для этого надо расход  $\dot{W}$  разделить на свободное сечение  $S_0$ , через которое в действительности перемещается поток:

$$u = \dot{W}/S_0.$$

Если числитель и знаменатель этого отношения умножить на  $S_{\text{кол}}$ , получим:

$$u = w/\varepsilon. \quad (1.1)$$

В то время как фиктивную скорость измерить очень легко и обычно она всегда известна аналитику, величину  $\varepsilon$  измерить значительно труднее. Многочисленные эксперименты показывают, что для хаотичной укладки сферических непористых частиц одинакового размера величина  $\varepsilon$  составляет 0,33—0,39, а при широком наборе размеров зерен  $\varepsilon = 0,35—0,45$ . Для шероховатых частиц различных размеров  $\varepsilon \approx 0,39—0,4$  [13]. Из приведенных данных видно, что  $\varepsilon$  для хаотичных укладок меняется сравнительно в узких пределах и для ориентировочных расчетов ее можно принять равной 0,5. Это значение  $\varepsilon$  характерно для газожидкостной хроматографии, в которой применяют малопористые сорбенты, так что подвижная фаза заполняет только промежутки между гранулами. В жидкостной хроматографии, как правило, используют пористые сорбенты, подвижная фаза заполняет не только промежутки между гранулами, но и поры, и  $\varepsilon$  может достигать 0,85—0,90.

Для точных расчетов  $\varepsilon$  следует определять экспериментально. Наиболее универсальный метод заключается в том, что в хроматографическую систему вводят дозу несорбирующегося компонента и фиксируют время от момента его ввода до появления максимума пика. Если принять, что несорбирующийся компонент движется в режиме идеального вытеснения, то указанное время  $t_0$  определяется соотношением

$$t_0 = V_0/\dot{W} = V_{\text{кол}}\varepsilon/\dot{W}, \quad (1.2)$$

откуда легко выражается  $\varepsilon$

$$\varepsilon = t_0\dot{W}/V_{\text{кол}}. \quad (1.3)$$

Все входящие в выражение (1.2) величины, легко определяются экспериментально. Необходимо при этом учитывать, что величина  $V_0$  будет включать наряду со свободным объемом колонки также и так называемые экстраколоночные объемы — объемы систем ввода и детектирования, а также подводящих коммуникаций. В некоторых случаях эти объемы  $V'_0$  можно рассчитать или определить отдельно, например, заполняя их водой, выливая и взвешивая последнюю. Тогда уравнение (1.2) можно переписать в виде

$$t_0 = (V_0 + V'_0)/W = (V_{\text{кол}} + V'_0)/W,$$

откуда

$$\varepsilon = (t_0 W - V'_0)/V_{\text{кол}} \quad (1.4)$$

Если такое определение  $V'_0$  вызывает затруднения, то можно повторить опыт по дозированию несорбирующегося компонента, заменив хроматографическую колонку тонкой трубкой известного объема  $V_T$  или просто соединив систему дозирования с системой детектирования тонким капилляром известного объема  $V_T$ . Полученное новое значение времени прохождения несорбирующимся компонентом системы  $t'_0$  выражается соотношением

$$t'_0 = (V_T + V'_0)/W,$$

откуда легко найти значение

$$V'_0 = t'_0 W - V_T$$

и подставить его в формулу (1.4).

Следует иметь в виду, что как будет показано ниже, скорость и соответственно расход подвижной фазы  $W$  в случае газовых сред меняется по длине колонки. В этом случае в формулах (1.3), (1.4) вместо  $W$  следует подставлять среднюю величину

$$W_{\text{ср}} = W_0 f,$$

где  $W_0$  — расход, измеряемый обычно на выходе колонки,  $f$  — поправка на перепад давления (см. ниже)

Важной проблемой при изучении течения является его режим, который может быть ламинарным или турбулентным. При ламинарном режиме жидкость или газ перемещаются параллельными слоями, без образования каких-либо вихрей, при этом передача вещества или энергии в поперечном направлении осуществляется за счет молекулярного механизма диффузии или теплопроводности. При турбулентном течении в потоке образуются вихри, за счет которых и происходит поперечный перенос. Переход от ламинарного к турбулентному потоку происходит при критическом значении числа Рейнольдса

$$\text{Re} = u d \rho / \mu$$

где  $d$  — определяющий диаметр

$u$  — средняя скорость течения,  $\rho$  — плотность,  $\mu$  — динамическая вязкость среды

При движении жидкости или газа по гладкому трубопроводу ( $d$  — диаметр трубы) турбулентация потока наступает при  $Re > 2200$ . В слое зернистого материала ( $d$  — диаметр частиц сорбента) она наступает значительно раньше — при  $Re > 20$ . Если оценить значение числа  $Re$  в реальных условиях хроматографического разделения, то окажется, что последнее происходит в ламинарном потоке при  $Re < 20$ .

Ламинарный характер течения в каналах между частицами позволяет сравнительно просто рассчитывать перепад давления по колонке, а также перенос вещества к поверхности зерна — так называемый внешний массоперенос.

Важнейшей задачей при изучении течения является определение перепада давления, необходимого для обеспечения заданной скорости. Рассмотрим сначала течение по прямому капилляру. При таком течении жидкость или газ испытывают трение о стенки капилляра. Это внешнее трение оказывается столь большим, что слой, непосредственно прилегающий к стенке, принимается неподвижным. По мере удаления от стенок скорость постепенно возрастает, достигая максимума на оси капилляра. Таким образом, слои, находящиеся на разных расстояниях от стенки, двигаются с разными скоростями, скользят друг относительно друга, преодолевая внутреннее трение, которое зависит от коэффициента вязкости  $\mu$ . Для преодоления силы внутреннего трения необходимо приложить внешнюю силу — перепад давления между концами капилляра  $\Delta P$ . С увеличением длины капилляра  $L$  площадь скольжения слоев увеличивается, сила трения возрастает и для поддержания прежней скорости требуется больший перепад давления. Поэтому во всех формулах используют перепад давления, отнесенный к единице длины капилляра  $\Delta P/L$ . Уравнение, связывающее среднюю по сечению скорость жидкости  $u$  с величиной  $\Delta P$ , получено Пуазейлем и имеет вид [14]:

$$u = \Delta P d^2 / (132\mu), \quad (1.5)$$

где  $d$  — диаметр капилляра.

Зернистый слой можно представить в виде системы капилляров. Имеется несколько моделей, согласно простейшей из которых, модели Козени — Кармана, зернистый слой представляется пучком изломанных капилляров, суммарная поверхность стенок которых в единице объема слоя равна внешней удельной поверхности слоя  $S_{\text{вн}}$ , а суммарное поперечное сечение определяется  $\epsilon$ . Предполагая далее, что все капилляры имеют одинаковый диаметр, а их средний угол наклона к оси колонки равен  $45^\circ$  можно получить уравнение Козени — Кармана [13]:

$$\Delta P/L = \xi_K [(1 - \epsilon)^2 / \epsilon^3] \mu a_0^2 u,$$

где  $\xi_K$  — полуэмпирическая константа Козени — Кармана, равная 4,5,  $a_0$  — отношение поверхности зерна к его объему, которое для шара диаметром  $d_p$  равно  $6/d_p$ .

Подставляя это значение  $a_0$  в уравнение Козени — Кармана, выражая из него  $u$  и объединяя величины  $\epsilon$ ,  $d_p$ ,  $\xi_K$ , характеризующие структуру слоя, в один коэффициент  $\xi$ , получим

$$u = (\Delta P / L) (\xi / \mu),$$

где  $\xi = \epsilon^3 d_p^2 / [36 \xi_K (1 - \epsilon)^2]$  — коэффициент проницаемости

Чем больше этот коэффициент, тем выше скорость потока при заданном перепаде давления или меньше перепад давления при заданной скорости. Для капилляра согласно уравнению (1.5)

$$\xi = d^2 / 32$$

Если не использовать выражение для  $\xi$  в форме, полученной Козени — Карманом, а рассматривать этот коэффициент как чисто эмпирический, то приходим к формуле Дарси. Последнюю часто используют в дифференциальном виде. Дело в том, что, как будет показано ниже, в случае газов скорость меняется по длине колонки, поэтому под  $u$  понимают ее значение в данной точке  $x$  по длине колонки ( $x=0$  в начале и  $x=L$  в конце колонки). Формула для  $u$  принимает вид

$$u = -(\xi / \mu) (dP / dx) \quad (1.6)$$

Нетрудно подсчитать, что значение  $\xi$  для капилляра на порядок больше, чем для зернистого слоя при  $d_p = d$ ,  $\epsilon = 0,5$  и  $\xi_K = 4,5$ . Это позволяет в капиллярной хроматографии использовать значительно более длинные колонки, чем в насадочной, и соответственно достигать более высокой эффективности разделения при том же самом давлении на входе. Чрезмерное увеличение последнего затрудняет ввод пробы, предъявляет повышенные требования к уплотнениям и в газовой хроматографии его обычно избегают.

Рассмотрим теперь сжимаемость газообразных подвижных фаз [15]. В жидкостной хроматографии, несмотря на наличие перепада давления, понуждающего жидкость перетекать по колонке, скорость или расход жидкости являются постоянными величинами, поскольку жидкости практически несжимаемы. В отличие от них газы сжимаемы, их объем уменьшается с ростом давления. Поэтому в газовой хроматографии на начальном участке колонки газ сжат и занимает минимальный объем, а по мере перемещения к концу колонки, попадая в области меньшего давления, постепенно расширяется, и его объем увеличивается. Соответственно увеличивается объемная и линейная скорость потока. Поведение идеального сжатого газа в изотермических условиях подчиняется закону Бойля — Мариотта:

$$PV = P_0 V_0 = P_1 V_1 = \text{const},$$

где  $PV$  — давление и объем газа, протекшего через данное произвольное сечение колонки,  $P_0$ ,  $V_0$  — те же величины на выходе,  $P_1$ ,  $V_1$  — те же величины на входе в колонку

Само произведение  $PV$  определяется количеством граммов или молей газа, которое в силу закона сохранения массы и отсутствия накопления газа в каких-либо сечениях колонки является для всех сечений постоянным. При делении всех произведений в записанных выше равенствах на интервал времени перейдем от объемов к расходам газа, а при делении последних на постоянное сечение колонки и порозность — к линейной скорости:

$$Pu = P_0 u_0 = P_i u_i = \text{const}$$

Если выразить  $u = P_0 u_0 / P$  и подставить в уравнение (1.6), получим

$$P_0 u_0 / P = -(\xi / \mu) (dP / dx).$$

После разделения переменных записанное дифференциальное уравнение легко интегрируется (по  $x$  от 0 до  $x$ , а по  $P$  от  $P_i$  до  $P$ ). В результате получаем

$$x = -\xi (P^2 - P_i^2) / (2P_0 u_0 \mu),$$

или после деления и умножения правой части на  $P_0^2$

$$x = \xi P_0 / (2u_0 \mu) [(P_i / P_0)^2 - (P / P_0)^2]. \quad (1.7)$$

Для выхода колонки, когда  $x = L$  и  $P = P_0$ , получим

$$L = \xi P_0 / (2u_0 \mu) [(P_i / P_0)^2 - 1]. \quad (1.8)$$

После деления уравнения (1.7) на уравнение (1.8), чтобы избавиться от величин, стоящих перед квадратными скобками, и в частности от неизвестной и трудноопределяемой на опыте величины  $\xi$ , получим для  $P$  уравнение

$$P / P_0 = \sqrt{(P_i / P_0)^2 - [(P_i / P_0)^2 - 1] x / L} \quad (1.9)$$

Его анализ показывает, что зависимость  $P$  от  $x$  нелинейна: на начальном участке колонки давление меняется слабее, чем на конечном, лишь при малом перепаде давления  $P_i / P_0$  эту зависимость можно приблизительно считать линейной.

Поскольку скорость газа непрерывно меняется вдоль колонки, время перемещения, например, несорбирующегося компонента приходится находить путем интегрирования. На элементарном участке скорость принимают постоянной и равной  $u$ , а время перемещения вдоль этого элемента равно  $dx / u$ . Для нахождения суммарного времени перемещения необходимо найти интеграл  $\int_0^L dx / u$ . С другой стороны, можно найти некоторую среднюю скорость  $u_{\text{ср}}$ , такую, что при делении длины колонки  $L$  на эту величину получим то же самое время перемещения:

$$L / u_{\text{ср}} = \int_0^L dx / u; \quad u_{\text{ср}} = L / \int_0^L dx / u. \quad (1.10)$$

Для вычисления интеграла выразим  $dx$  из уравнения (1.7),

а  $u$  представим в виде  $u = u_0 P_0 / P$ . В результате меняя пределы интегрирования: при  $x=0$   $P=P_i$ , при  $x=L$   $P=P_0$ , получим

$$\int_0^L dx/u = -[\xi / (\mu P_0^2 u_0^2)] \int_{P_i}^{P_0} P^2 dP = \xi (P_i^3 - P_0^3) / (3\mu P_0^2 u_0^2) = [\xi P_0 / (3\mu u_0^2)] [(P_i/P_0)^3 - 1]$$

Подставив этот интеграл в уравнение (1.10) для  $u_{cp}$ , а  $L$  выразив через уравнение (1.8), найдем

$$u_{cp} = 3/2 u_0 [(P_i/P_0)^2 - 1] / [(P_i/P_0)^3 - 1]$$

Все выражение  $3/2 [(P_i/P_0)^2 - 1] / [(P_i/P_0)^3 - 1]$  будем в дальнейшем называть поправкой на перепад давления и обозначать черз  $f$ :

$$u_{cp} = u_0 f$$

Эта поправка включает в себя только измеряемые давления  $P_i$  и  $P_0$  на входе и выходе колонки и позволяет по измеряемой скорости на выходе колонки  $u_0$  рассчитывать среднюю скорость газа в колонке. Пользуясь значением средней скорости, мы сможем в дальнейшем рассчитывать времена перемещения компонентов по колонке так, как если бы это перемещение происходило равномерно с постоянной скоростью  $u_{cp}$ .

В заключение остановимся кратко на течении подвижной фазы в тонкослойной хроматографии. Пластину с нанесенным на ее поверхность слоем сорбента опускают одним концом в ванночку с растворителем и помещают в камеру, насыщенную его парами. Движение подвижной фазы по слою осуществляется за счет капиллярных сил, аналитик обычно не регулирует этот поток. Известно, что жидкость в капилляре образует мениск, причем возникает разность давления  $\Delta P$  в жидкой и газовой фазе, равная [14]

$$\Delta P = 2\eta \cos \varphi / r_k,$$

где  $\eta$  — поверхностное натяжение,  $\varphi$  — угол смачивания,  $r_k$  — радиус капилляра

Если подставить это значение  $\Delta P$  в формулу Пуазейля (1.5), получим

$$u = \eta \cos \varphi r_k / 4L\mu$$

Из этого выражения следует, что скорость перемещения уменьшается с увеличением пройденного жидкостью расстояния  $L$ , поскольку при этом, как уже говорилось, возрастает сила внутреннего трения жидкости за счет увеличения поверхности трения; хроматографическое разделение протекает в условиях снижающейся со временем скорости течения.

Предложены специальные камеры, позволяющие проводить разделение в потоке подвижной фазы, движение которой вызывается насосами. В этом случае закономерности течения сходны с закономерностями, наблюдаемыми в колоночной хроматографии.



### 2.2.2. Статика сорбции

В основе хроматографического разделения лежат прежде всего сорбционные процессы. Как большинство физико-химических процессов они проходят две стадии: стадию приближения к равновесию, которая разворачивается во времени, характеризуется определенной скоростью и изучается в разделе кинетики сорбции, и стадию собственно равновесную, закономерности которой описываются статикой сорбции. Последняя стадия играет решающую роль в достижении хроматографического разделения; мы рассмотрим ее прежде всего, дав вначале несколько общих определений.

Под сорбцией понимают поглощение газов, паров или растворенных веществ твердыми или жидкими поглотителями. При этом поглощаемые вещества называют сорбатами, а поглотители — сорбентами. Если при этом сорбат поглощается всем объемом сорбента, то процесс называют абсорбцией, а если он концентрируется на поверхности сорбента, то адсорбцией; соответственно и сорбенты делятся на абсорбенты и адсорбенты. Чаще всего адсорбентами являются твердые тела с развитой поверхностью, в хроматографии широко применяют для этой цели силикагели, алюмогели, активные угли, молекулярные сита, пористые полимерные сорбенты. Жидкие поглотители (абсорбенты) сами по себе в аналитической хроматографии не используют, их обычно наносят на поверхность твердых материалов с относительно небольшой поверхностью, которые называют твердыми носителями. В этом случае наряду с абсорбцией и адсорбцией на поверхности жидкого поглотителя, называемого в хроматографии неподвижной фазой, может происходить адсорбция и на поверхности твердого носителя. Таким образом, в хроматографии применяют два основных типа сорбентов: твердые адсорбенты и неподвижные фазы, нанесенные на твердый носитель.

Предположим, что в замкнутом сосуде находится некоторое количество сорбента и растворитель или какой-либо газ (газ-носитель). Если внести в этот сосуд сорбат, растворимый в растворителе, или его пары, так чтобы исходная концентрация в растворе или газовой фазе составила  $C_0$ , то можно будет наблюдать постепенное уменьшение этой концентрации за счет поглощения сорбата из раствора или газовой фазы сорбентом. Через некоторое время изменение концентрации прекратится и установится сорбционное равновесие, характеризуемое определенным соотношением между оставшейся концентрацией сорбата в растворе (газовой фазе)  $C$  и возникшей концентрацией сорбата на сорбенте  $C_c$ . В области низких концентраций, с которыми обычно имеют дело в аналитической хроматографии, это соотношение описывается линейным законом (законом Генри)

$$C_c = KC.$$

(I.11)

Обычно концентрацию  $C$  измеряют в  $\text{мг/см}^3$  или  $\text{мкмоль/см}^3$ , в этих же единицах измеряют и  $C_s$  в случае применения неподвижных фаз. Тогда истинный коэффициент Генри  $K$  (коэффициент распределения) будет безразмерным. При использовании адсорбентов  $C_s$  чаще измеряют в  $\text{мг/г}$  или  $\text{мкмоль/г}$  и  $K$  приобретает размерность, хотя зная плотность адсорбента, нетрудно формально представить величину  $C_s$  в тех же единицах, что и при абсорбции. В дальнейшем будем считать, что  $K$  — безразмерная величина. Она зависит от природы сорбента, сорбата, растворителя (или газа-носителя, если последний сорбируется), а также температуры.

Если увеличивать концентрацию  $C$ , например, путем увеличения  $C_0$ , то начиная с определенного предела, коэффициент  $K$  также начнет изменяться. При таких высоких концентрациях уже нельзя характеризовать сорбционное равновесие одним коэффициентом  $K$ , а следует определять всю изотерму сорбции — функциональную зависимость  $C_s = f(C)$ . График такой зависимости чаще всего представляет собой монотонную кривую — выпуклую или вогнутую по отношению к оси ординат. Имеется большое число уравнений, описывающих эти функции. Поскольку в аналитической практике редко имеют дело с большими концентрациями (исключение составляет анализ микропримесей, когда в колонку дозируют большие концентрации основного вещества), мы не будем подробно описывать нелинейные зависимости, а будем основываться на линейном уравнении (I.11)

Кроме истинного коэффициента Генри в хроматографии используют еще две модификации этого коэффициента [16]. Предположим, что хроматографическая колонка заполнена гранулированным сорбентом и мы рассматриваем единицу объема ( $1 \text{ см}^3$ ) полученного слоя. Некоторую долю этого объема  $\varepsilon$  заполняют пустоты, а некоторую  $\kappa$  сам сорбент, причем в случае неподвижной фазы, нанесенной на твердый носитель,  $\varepsilon + \kappa < 1$ , поскольку часть объема занимает твердый носитель, в разделениях не участвующий, а потому и не учитываемый, т. е. в данном случае  $\kappa$  — это доля объема, приходящаяся только на неподвижную фазу. Если на этой единице объема сорбента установится сорбционное равновесие, общее количество вещества в рассматриваемом  $1 \text{ см}^3$  слоя составит

$$a = \varepsilon C + \kappa C_s. \quad (\text{I.12})$$

Общим коэффициентом Генри  $\Gamma$  называют отношение [16]

$$\Gamma = a/C,$$

где  $a$  — масса сорбата в  $1 \text{ см}^3$  объема слоя;  $C$  — концентрация сорбата в растворе или газе.

Подставляя в это соотношение уравнение (I.12), получим

$$\Gamma = \varepsilon + \kappa K \quad (\text{I.13})$$

Частным коэффициентом Генри (фактором емкости)  $k'$  называют отношение

$$k' = C_{\kappa} / C_{\epsilon} = \frac{\text{Масса сорбата, сорбированная в } 1 \text{ см}^3 \text{ слоя}}{\text{Масса сорбата в растворе или газовой фазе в } 1 \text{ см}^3 \text{ слоя}}$$

Это уравнение с учетом уравнения (I.11) можно переписать в виде

$$k' = K(\kappa/\epsilon) \quad (I.14)$$

В отличие от истинного коэффициента Генри, который является физико-химической константой для данной системы сорбат — сорбент и может содержаться в соответствующих таблицах, общий и частный коэффициенты Генри зависят от свойств хроматографической насадки  $\epsilon$  и  $\kappa$ . В частности, можно существенно менять значения  $\Gamma$  и  $k'$ , варьируя  $\kappa$  путем нанесения на твердый носитель различных количеств неподвижной фазы. Значение  $\epsilon$ , а также отношение  $\kappa/\epsilon$  существенно различаются в насадочных и капиллярных колонках, что в значительной мере обуславливает различие в свойствах колонн этих типов. Как видно из определения,  $k'$  характеризует соотношение между сорбированным и несорбированным количеством вещества, т. е. соотношение емкостей сорбента и свободного пространства слоя.

Введение общего и частного коэффициентов Генри имеет особый смысл, если принять во внимание динамический характер сорбционного равновесия. Последнее не следует понимать таким образом, что часть молекул сорбата все время находится в газовой фазе или растворе, а часть в сорбированном состоянии. На самом деле между сорбированными и «свободными» молекулами все время происходит обмен: одни молекулы, достигнув поверхности сорбента, поглощаются им, а другие, до этого поглощенные, пересекают поверхность раздела и переходят обратно в газовую фазу или раствор. Если следить за какой-либо молекулой, то можно будет увидеть, что часть времени  $t_a$  она находится в сорбированном, а часть  $t_d$  — в свободном состоянии. Чем больше  $t_a$ , тем большая часть молекул находится в данное время в сорбированном состоянии, т. е. сильнее сорбция. Оказывается, что эти величины связаны между собой простым соотношением:

$$t_a/t_d = \frac{\text{Масса сорбата на сорбенте на } 1 \text{ см}^3 \text{ слоя}}{\text{Масса сорбата в газе или растворе на } 1 \text{ см}^3 \text{ слоя}}$$

В правой части написанного уравнения фигурирует именно количество вещества на  $1 \text{ см}^3$  слоя, а не просто равновесные концентрации  $C$  и  $C_c$ : изменение, например, содержания непод-

вижной фазы  $\kappa$  никак не связано с этими концентрациями, являющимися, как уже говорилось, физико-химическими константами, но оно должно влиять на время пребывания: при  $\kappa \rightarrow 0$ ,  $t_a \rightarrow 0$ . Расшифруем теперь записанное соотношение, используя уравнение (I.14):

$$t_a/t_d = k'. \quad (\text{I.15})$$

Полученное равенство раскрывает еще один смысл частного коэффициента Генри: последний равен отношению времен пребывания молекул в сорбированном и свободном состоянии. Для хроматографии кроме отношения  $t_a/t_d$  важно отношение  $t_d/(t_a + t_d)$ , характеризующее долю времени, когда молекула находится в свободном состоянии. Разделив и числитель и знаменатель на  $t_d$  получим

$$t_d/(t_a + t_d) = 1/(1 + k') = R. \quad (\text{I.16})$$

Величиной  $R$  также часто пользуются в некоторых видах хроматографии, в частности в жидкостной и тонкослойной.

Рассмотрим природу сил, заставляющих молекулы концентрироваться на поверхности адсорбента или поглощаться пленкой неподвижной фазы.

В общем силы взаимодействия между сорбатом и сорбентом можно назвать физическими или ван-дер-ваальсовыми. Это те же силы, которые проявляются в жидкостях, удерживая молекулы последних друг возле друга, в сжатых газах, вызывая отклонение их поведения от законов идеальных газов, в некоторых так называемых молекулярных кристаллах, например твердой углекислоте.

Силы взаимодействия, возникающие при сорбции, сводятся к ориентационным, индукционным, дисперсионным и специфическим [15]. Многие молекулы обладают постоянным дипольным моментом, т. е. центры тяжести их положительных и отрицательных зарядов смещены друг относительно друга, хотя в целом молекула, конечно, электронейтральна. Такие молекулы называют полярными. Дело в том, что наряду с ковалентными связями, например  $\text{C}-\text{C}$  и  $\text{C}-\text{H}$ , в которых электроны в равной степени принадлежат обоим атомам, имеются полярные связи, в которых электроны оттянуты к более электроотрицательному атому (связи  $\text{O}-\text{H}$ ,  $\text{N}-\text{H}$  и др.). При определенной направленности этих связей молекула приобретает дипольный момент. Классическим примером является молекула воды, у которой две связи  $\text{OH}$  направлены под углом друг к другу, так что положительные заряды двух сильно протонизированных атомов водорода оказываются смещенными относительно отрицательного заряда атома кислорода. Дипольными моментами обладают также спирты, нитросоединения, амины, альдегиды, кислоты, галогензамещенные соединения и др. При растворении полярных сорбатов

в полярных абсорбентах электростатическое притяжение противоположно заряженных концов диполей и вызывает образование ориентационных взаимодействий. Некоторые адсорбенты, такие как силикагели, молекулярные сита, некоторые пористые полимеры, несут на поверхности локально сконцентрированный заряд (чаще положительный), в то время как компенсирующий заряд противоположного знака рассредоточен по группе атомов значительного размера. Взаимодействие такого локально сконцентрированного заряда с одним из концов диполей также приводит к ориентационному эффекту.

Некоторые неполярные молекулы, например ароматические и непредельные соединения, под влиянием дипольных моментов абсорбента или локальных зарядов адсорбента способны деформироваться с образованием наведенного дипольного момента. Взаимодействие последнего с полярной молекулой или локальным зарядом называют индукционным, обычно оно не превышает 5—7% от общей энергии взаимодействия, однако и этого вклада часто оказывается достаточно для хроматографического разделения.

Наиболее универсальным является дисперсионное взаимодействие, проявляющееся и между неполярными молекулами и носящее квантово-механический характер. Очень грубо можно представить его на примере двух атомов водорода. Каждый атом, конечно, не имеет постоянного дипольного момента, но если зафиксировать в какой-то момент времени положение электрона, то он окажется смещенным по отношению к протону, а весь атом — обладающим мгновенным дипольным моментом. При сближении двух атомов возникает синхронизация в движении электронов, так что мгновенные дипольные моменты начинают взаимодействовать друг с другом. Дисперсионные взаимодействия являются определяющими при растворении насыщенных углеводородов в углеводородных или метилсилоксановых неподвижных фазах, а также при их адсорбции на углеродных адсорбентах.

К специфическим взаимодействиям, играющим наиболее существенную роль во многих хроматографических разделениях, относят водородную связь и донорно-акцепторные взаимодействия [15]. При образовании химической связи между водородом и электроотрицательными атомами фтора, кислорода, азота последние оттягивают на себя электрон, так что водород оказывается сильно протонизированным. Если молекула, имеющая такие атомы водорода, сближается с другими молекулами, обладающими резко смещенной к периферии электронной плотностью или атомами с неподеленными электронными парами, то между такими молекулами устанавливается водородная связь. Она образуется между молекулами воды, органических кислот, спиртов, эфиров, первичных аминов и неподвижными фазами,

обладающими соответствующими группами. Из адсорбентов склонность к образованию водородных связей проявляют кремнеземы (силикагель, силохром, диатомиты, пористые стекла), несущие на поверхности гидроксильные группы с сильно протонизированным атомом водорода.

Специфические взаимодействия устанавливаются между полярными и неполярными молекулами, если последние, не обладая в целом дипольными моментами, характеризуются в то же время неравномерностью в распределении электронной плотности, сосредоточением ее на определенных участках молекулы. Особенно большое значение среди таких молекул имеют молекулы непредельных и ароматических соединений. Двойные связи не являются равноценными: одна  $\sigma$ -связь расположена в плоскости молекулы, в то время как электронные облака, образующие вторую  $\pi$ -связь, вытянуты и располагаются в плоскости, перпендикулярной плоскости молекулы. Эти электронные облака способны специфически взаимодействовать с полярными молекулами неподвижной фазы или зарядами, локально сконцентрированными на поверхности адсорбента, а также с аналогичными электронными облаками, если сорбент содержит двойные связи. Сказанное относится и к тройным связям: в этом случае третья  $\pi$ -связь расположена перпендикулярно как к плоскости молекулы, так и к плоскости второй  $\pi$ -связи.

Следует иметь в виду, что ряд молекул, не имея дипольного, обладает так называемым квадрупольным моментом; хотя заряды в них расположены симметрично, они смещены друг относительно друга. Примером может служить молекула  $\text{CO}_2$ , в которой оба атома кислорода, несущие избыточный отрицательный заряд, расположены на одной линии с атомом углерода, что обеспечивает, в отличие от воды, отсутствие дипольного момента. Однако эта молекула за счет квадрупольного момента также способна к специфическому взаимодействию. Возможно проявление при сорбции также и некоторых видов комплексобразования.

### 2.2.3. Случайные процессы

Большое влияние на хроматографическое разделение наряду с сорбционными оказывают различные случайные процессы. Рассмотрим некоторые общие понятия теории вероятностей и теории случайных процессов. Наиболее просто рассмотреть их на примере молекулярной диффузии.

Молекулярная диффузия возникает вследствие теплового хаотического движения молекул и приводит к их рассеиванию. Предположим, что мы имеем газ, содержащий меченые молекулы, которые в начальный момент помещаем в начальную точку. Совместим с этой точкой начало системы координат, по оси абс-

цисс которой будем откладывать расстояние от начальной точки, а по оси ординат — число молекул в каждой точке пространства. В газе молекулы непрерывно сталкиваются друг с другом, при этом каждое столкновение вызывает изменение скорости и направления движения, т. е. каждая молекула совершает хаотические блуждания в пространстве. В результате этих блужданий молекулы через некоторое время окажутся в разных точках пространства и первоначально резкий концентрационный профиль (все молекулы характеризуются одним значением абсциссы  $x=0$ ) окажется размытым, а молекулы каким-то образом распределенными в пространстве. Характерной особенностью этого процесса является случайный непредсказуемый характер перемещения каждой индивидуальной молекулы, ее координата  $x$  по истечении определенного времени является случайной величиной. Диффузия в жидкости протекает сходным образом. Главное отличие заключается в том, что данная молекула большую часть времени находится вблизи соседних молекул, но время от времени вырывается из своей ячейки и перемещается в другое положение. Направление и длина таких перемещений непредсказуемы, их совокупность образует хаотичный путь, проходимый каждой молекулой.

По истечении некоторого времени  $t$  можно измерить количество (концентрацию) молекул в каждой точке пространства  $x$ . Полученное распределение концентраций  $C=f(x)$  характеризует также вероятность нахождения молекулы в данной точке пространства, т. е. может трактоваться как закон распределения случайной величины  $x$ . Для пояснения последнего утверждения обратимся к конкретному примеру. Пусть исходное число молекул было большим, например равным 1000, и данной точки абсциссы  $x$  через определенный интервал времени достигло 100 молекул. На практике, конечно, следует говорить не о точке  $x_i$ , а о некотором интервале  $\Delta x_i$ , в центре которого находится точка  $x_i$ ; плавная кривая распределения получается как предельное состояние ступенчатой гистограммы при  $\Delta x_i \rightarrow 0$  (рис. 1.5).

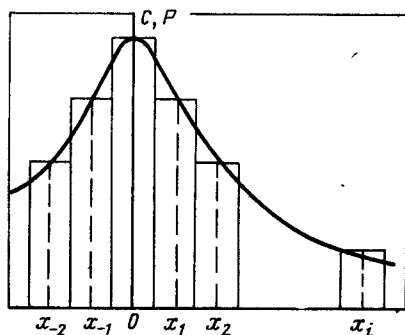


Рис. 1.5. Гистограмма и кривая распределения концентрации молекул по оси  $x$ . Эта же кривая характеризует распределение случайной величины  $x$  — вероятность обнаружения молекулы в данной точке  $x$ .

Концентрацию  $C_i$  получим разделив эти 100 молекул на объем  $\Delta V_i$ , соответствующий интервалу  $\Delta x_i$ . Кроме того, находим, что из 1000 испытаний 100 привело к интересующему нас событию: попаданию в интервал  $\Delta x_i$  и значит частота этого события равна  $100/1000=0,1$ . Тогда вероятность события, состоящего в попадании данной конкретной молекулы в интервал  $\Delta x_i$ , также равна  $P=0,1$ . Поскольку и  $C$  и  $P$  получаются путем деления числа 100 на постоянные величины  $\Delta V_i$  и общее число молекул 1000, то  $C$  и  $P$  пропорциональны друг другу и оба распределения можно совместить, просто меняя масштаб по оси ординат.

В дальнейшем мы будем рассматривать их как одно распределение. Некоторые свойства этих распределений легко получить из общих соображений. Во-первых, молекулы с одинаковой вероятностью могут смещаться как влево, так и вправо от оси ординат, поэтому распределение должно быть симметрично относительно этой оси. Во-вторых, по мере удаления от оси ординат концентрация должна падать и при  $x \rightarrow \infty$   $C \rightarrow 0$ ; наивысшее значение — максимум кривой расположен при  $x=0$ .

Положение каждой молекулы в пространстве, т. е. ее координата  $x$ , являющаяся, как уже указывалось, случайной величиной, определяется совокупным воздействием огромного числа малых случайных событий — столкновений данной молекулы с другими. Согласно положениям теории вероятности, распределение случайной величины, являющейся суммой очень большого числа взаимно независимых случайных величин, описывается нормальным законом или законом Гаусса:

$$C=(1/\sqrt{2\pi}\sigma) e^{-x^2/2\sigma^2}.$$

При  $x=0$  показатель экспоненты также равен 0 и все выражение  $e^{-x^2/2\sigma^2}$  имеет максимальное значение, равное 1. Поскольку коэффициент перед экспоненциальным членом является постоянной величиной, не зависящей от  $x$ , величина  $C$  при  $x=0$ , как и указывалось выше, достигает максимального значения  $C=C_{\text{макс}}=1/(\sqrt{2\pi}\sigma)$ . Отсюда уравнение Гаусса можно переписать в виде

$$C=C_{\text{макс}} e^{-x^2/2\sigma^2}. \quad (1.17)$$

Записанное выражение характеризует распределение концентрации в пространстве (в фиксированный момент времени) и имеет параметр  $\sigma$ , называемый средним квадратичным отклонением, величину  $\sigma^2$  называют дисперсией.

Поясним смысл этих величин [17]. Любая случайная величина, распределенная по определенному закону, в частности нормальному, характеризуется несколькими показателями. Это, во-первых, среднее значение случайной величины, которое подсчитывают путем умножения каждого значения случайной величины на вероятность этого значения с последующим суммированием полученных произведений:



$$x_{\text{ср}} = \sum x_i P_i.$$

В случае непрерывных распределений суммирование заменяют интегрированием. При нормальном законе распределения, симметричном относительно оси ординат, каждому значению  $x_i$  соответствует отрицательное значение  $-x_i$ , имеющее ту же вероятность  $P_i$ , поэтому все слагаемые сократятся и  $x_{\text{ср}} = 0$ .

Кроме среднего значения важным показателем случайной величины является ее рассеяние вокруг среднего значения. Важность этого показателя ярко проявляется при анализе погрешностей. При отсутствии систематических погрешностей положительные и отрицательные отклонения от истинного значения уравнивают друг друга и средняя погрешность равна нулю. Однако ответа на вопросы, насколько сильно рассеяны результаты, будут ли они в своем большинстве ложиться близко к истинному значению, так что можно будет с большой надежностью рассчитывать на каждый результат, или раскиданы по обе стороны на большом расстоянии от истинного значения, знание средней погрешности не дает.

Имеются разные способы характеристики рассеяния. Наиболее естественной величиной является среднее отклонение. Отклонение случайного значения  $x_i$  от среднего значения  $x_{\text{ср}}$  само есть случайная величина с той же вероятностью  $P_i$ . Случайной величиной будет и абсолютное значение  $|x_i - x_{\text{ср}}|$ . Среднее отклонение  $M_x$  получается в результате усреднения всех значений  $|x_i - x_{\text{ср}}|$ :

$$M_x = \sum |x_i - x_{\text{ср}}| P_i.$$

На практике вычисление абсолютных значений иногда оказывается неудобным и чаще всего рассеяние характеризуют средним квадратичным отклонением. Чтобы избавиться от знака, величины  $(x_i - x_{\text{ср}})$  возводят в квадрат и вычисляют среднее значение этого квадрата:

$$\sigma^2 = \sum (x_i - x_{\text{ср}})^2 P_i,$$

которое и называют дисперсией. В случае непрерывных распределений, как и ранее, суммирование заменяют интегрированием

$$\sigma^2 = \int_{-\infty}^{+\infty} (x - x_{\text{ср}})^2 P(x) dx.$$

Извлекая квадратный корень из величины дисперсии, мы получаем величину, характеризующую сам разброс случайной величины и называемую средним квадратичным отклонением.

Если обратиться к нормальному закону распределения, то его дисперсия или среднее квадратичное отклонение характеризуют степень размытия кривой распределения, ее ширину (рис. 1.6). Чтобы придать величине  $\sigma$  графическую интерпре-

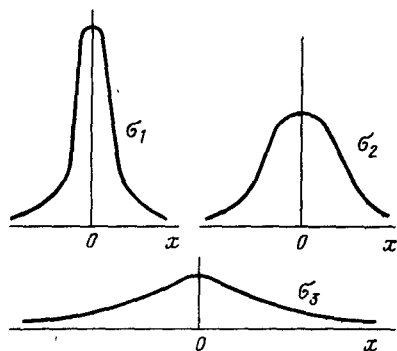


Рис. 1.6. Кривые Гаусса с одинаковыми средними значениями  $x_{ср}=0$ , но разными дисперсиями:  $\sigma_1^2 < \sigma_2^2 < \sigma_3^2$

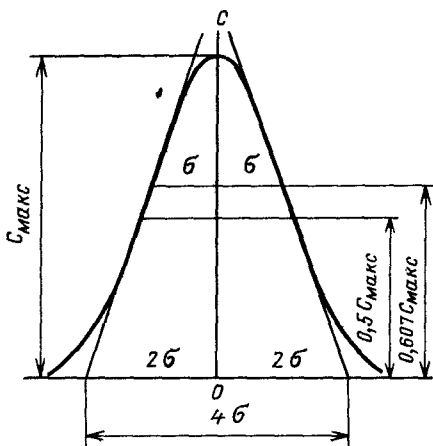


Рис. 1.7. Параметры распределения Гаусса

тацию, обратимся к выражению (I.17) и зададимся величиной  $C/C_{\text{макс}} = e^{-1/2} = 0,607$ :

$$e^{-1/2} = e^{-x^2/2\sigma^2},$$

откуда, приравнивая показатели экспонент, найдем  $x = \sigma$ . Это означает, что полуширина кривой распределения, измеренная на высоте, составляющей 0,607 от максимальной, равна среднеквадратичному отклонению (рис. 1.7).

Кривая Гаусса имеет колоколообразную форму: наряду с максимумом она имеет две точки перегиба. Если провести касательные к этим точкам, то длина отрезка, отсекаемая касательными на оси абсцисс, составляет  $4\sigma$ . Вообще, ширина кривой, измеренная на высоте, составляющей некоторую долю от максимальной, будет пропорциональна  $\sigma$ , причем коэффициент пропорциональности определяется исключительно величиной этой доли.

Мы рассмотрели некоторые стороны случайных процессов на примере молекулярной диффузии. Однако в хроматографии возникают и другие случайные процессы, которые сложно описывать непосредственно на основе теории вероятности. Мы выявим поэтому закономерности простейшего случайного процесса, на основе которых дадим количественное описание процессов размывания пиков в хроматографии. Этот простейший случайный процесс заключается в следующем [18]. Пусть первоначально объекты размещены в начальной точке и перемещаются вперед или назад на ступень фиксированной длины. Направление перемещения целиком определяется случаем: можно, например, кидать монету и при выпадении «орла» двигать объект вперед, в

противном случае назад. Этот процесс напоминает рассмотренные выше молекулярные перемещения, отличаясь, однако, фиксированностью длины ступени. Будем эту длину принимать равной средней длине свободного пробега молекул. Случайные движения вперед и назад приводят каждый объект в разное конечное положение, что будет означать размытие первоначально резкого профиля. Полученная кривая распределения будет также описываться уравнением Гаусса со средним квадратичным отклонением [18]

$$\sigma = l\sqrt{n}, \quad (1.18)$$

где  $l$  — длина ступени;  $n$  — их число.

Поскольку это выражение будет широко применяться в дальнейшем, следует попытаться его обосновать, не приводя громоздкого вывода. Проще всего объяснить пропорциональность между  $\sigma$  и  $l$ . Смещение объекта от первоначального положения возникает из-за того, что число ступеней вправо  $n_+$  отличается от числа ступеней влево  $n_-$ , так что суммарное смещение  $x = (n_+ - n_-)l$ . Таким образом, с увеличением  $l$  смещение каждого объекта, а следовательно и  $\sigma$  должно увеличиваться пропорционально  $l$ .

Сложнее объяснить, почему  $\sigma \sim \sqrt{n}$ . Довольно просто понять, почему между  $\sigma$  и  $n$  отсутствует прямая пропорциональность. Пусть в результате  $n$  ступеней объект сместился на расстояние  $x$ . Если удвоить число ступеней, то объект может удвоить расстояние  $x$ , но может и начать двигаться в обратном направлении. В среднем за счет определенного количества возвратов удвоение  $n$  приводит не к удвоению  $x$ , а к более слабой зависимости  $x$  от  $n$ . Можно дать более точное обоснование зависимости  $\sigma \sim \sqrt{n}$ , обратившись опять к задаче бросания монет и считая, что  $n_+$  соответствует числу выпадений «орла», а  $n_-$  — числу противоположных событий. С увеличением числа бросаний частота выпадения «орла» будет приближаться к вероятности его выпадения, т. е. к  $1/2$ , однако абсолютное значение разности между числом выпадений «орла» и «решки» будет увеличиваться хотя бы в силу увеличения числа испытаний. Так, если мы бросаем монету 10 раз, то эта разность во всяком случае не может быть больше 10. В опыте же Бюффона, осуществленном в XVIII в., из 4040 бросаний «орел» выпал 2048 раз. И хотя, как видим, частота, равная 0,507, мало отличалась от 0,5, разность между выпадением «орла» и «решки» равнялась 56.

Сам закон  $\sigma \sim \sqrt{n}$  можно обосновать из неравенства Чебышева [17]. Пусть некоторое событие имеет вероятность  $P$  и мы проводим  $n$  испытаний, тогда наивероятнейшее число появления благоприятного события (выпадения «орла») равно  $nP$ . Реальное появление этого события  $k$  будет отличаться по абсолютной величине от  $nP$  на малую долю  $\rho$  от числа  $n$ . Согласно неравен-

ству Чебышева, вероятность того, что разность  $|k - nP|$  превосходит  $\rho n$ , дается соотношением

$$P_k(|k - nP| > \rho n) < P(1 - P) / (\rho^2 n).$$

Зафиксируем значение  $P_k$ , примем  $P = 0,5$  и, заменив неравенство на равенство, получим  $P_k = 0,25 / \rho^2 n$ . Выразим отсюда  $\rho$  и подставив в выражение, стоящее в скобках, найдем

$$|k - nP| > (0,5 / \sqrt{P_k}) \sqrt{n}.$$

Отсюда ясно видно, что при зафиксированной вероятности  $P_k$  разность числа реальных и наименее вероятных выпадений «орлов» и «решек» увеличивается пропорционально  $\sqrt{n}$ . Например, положим  $P_k = 0,01$ , тогда при  $n = 10\,000$ , разность  $|k - nP| > 500$ . Другими словами, число выпадений «орлов» с вероятностью 0,99 колеблется от 9500 до 10 500, а, соответственно, разность выпадения «орлов» и «решек» составляет 1000. При  $n = 10^6$  эта разность увеличится до 10 000.

Соотношение (1.18) позволяет легко получить важное соотношение для дисперсии

$$\sigma^2 = l^2 n.$$

Предположим, что объект после совершения серии из  $n_1$  ступеней совершает одну серию из  $n_2$  ступеней. Два последовательных процесса приведут к такому же смещению, как и после совершения одной серии из  $(n_1 + n_2)$  ступеней. Для последней можно записать

$$\sigma^2 = l^2 (n_1 + n_2) = l^2 n_1 + l^2 n_2.$$

Но  $l^2 n_1 = \sigma_1^2$  — это дисперсия после совершения первых ступеней, а  $l^2 n_2 = \sigma_2^2$  — дисперсия после совершения  $n_2$  ступеней, если бы они произошли независимо от первых. Отсюда получаем

$$\sigma^2 = \sigma_1^2 + \sigma_2^2$$

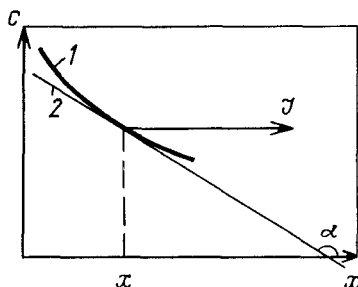
Последнее соотношение можно распространить на случай нескольких независимых процессов, причем более сложных, чем рассматриваемый здесь.

## 2.2.4. Диффузия

В результате хаотического движения молекул они непрерывно перетекают из области, где их концентрация выше, в область, где она ниже, в результате чего происходит постепенное выравнивание концентраций. Причину этого легко понять, представив себе трубку, разделенную перегородкой и заполненную газом, концентрация меченых молекул в которой слева от перегородки выше, чем справа. Число соударений меченых молекул с перегородкой пропорционально концентрации и поэтому число таких

Рис. 1.8. Направление диффузионного потока  $J$  и градиента концентрации  $dC/dx = \operatorname{tg} \alpha$  в точке  $x$ :

1 — зависимость  $C = f(x)$ , 2 — касательная к кривой  $C = f(x)$  в точке  $x$  ( $\operatorname{tg} \alpha < 0$ )



ударов в левую ее сторону больше чем в правую. Если убрать перегородку, то начнется переток молекул слева направо до тех пор, пока концентрации не выровняются. Количественно величина диффузионного потока  $G$  описывается первым законом Фика

$$G = -D (dC/dx), \quad (I.19)$$

где  $D$  — коэффициент диффузии, характеризующий интенсивность диффузии;  $dC/dx$  — градиент концентрации.

Знак «минус» указывает на несовпадение знаков градиента и потока: поток будет течь слева направо, т. е. в положительном направлении оси  $x$ , в том случае, если концентрация будет уменьшаться в этом направлении и величина  $dC/dx$  будет отрицательной (рис. 1.8).

По мере протекания диффузионного процесса концентрация в каждой точке будет меняться, т. е. она является функцией двух переменных: координаты  $x$  и времени  $t$ . Зависимость  $C = f(x, t)$  в дифференциальной форме описывается вторым законом Фика

$$\partial C / \partial t = D \partial^2 C / \partial x^2, \quad (I.20)$$

согласно которому скорость изменения концентрации в данной точке пространства  $x$  пропорциональна второй производной концентрации по координате  $x$ . Интегрирование уравнения (I.20) при условии, что первоначально молекулы были сосредоточены в точке  $x = 0$ , позволяет получить явную зависимость  $C = f(x, t)$ , совпадающую в целом с уравнением (I.17).

$$C = C_{\max} e^{-x^2/4Dt}. \quad (I.21)$$

Из сравнения уравнений (I.17) и (I.21) следует, что

$$\sigma^2 = 2Dt. \quad (I.22)$$

Из последнего соотношения, называемого уравнением Эйнштейна, видно, что дисперсия кривой распределения пропорциональна времени, т. е. это распределение постепенно размывается в пространстве.

Из уравнения Эйнштейна наиболее явно вырисовывается смысл коэффициента диффузии. Среднее квадратичное отклонение  $\sigma$  характеризует среднее смещение молекул от первоначального положения, это как бы путь, проделанный молекулами за время  $t$  в результате диффузии. В отличие от механического равномерного движения, когда путь пропорционален времени, в диффузионном процессе времени пропорционален квадрат смещения, причем если в первом случае интенсивность движения характеризуется скоростью, то во втором сходную роль играет коэффициент диффузии — это показатель интенсивности диффузионного смещения, равный отношению квадрата смещения ко времени, в течение которого это смещение осуществилось. В случае бинарной газовой смеси для расчета коэффициента диффузии чаще всего пользуются уравнением Джилленда

$$D = \frac{0,0043 T^{3/2} (1/M_1 + 1/M_2)^{1/2}}{P (\Omega_1^{1/3} + \Omega_2^{1/3})^2}, \quad (I.23)$$

где  $T$  — абсолютная температура,  $P$  — давление;  $M$  — молекулярная масса;  $\Omega$  — мольный объем при нормальной температуре кипения; индексы 1 и 2 относятся к первому и второму компонентам.

Видно, что коэффициент диффузии увеличивается с ростом температуры и уменьшается с увеличением давления, он имеет большее значение для легких газов.

Для жидкостей коэффициент диффузии определяется уравнением

$$D_{\text{ж}} = v_{\text{м}} k T, \quad (I.24)$$

где  $k$  — постоянная Больцмана;  $v_{\text{м}}$  — подвижность молекул, т. е. стационарная скорость, приобретаемая ими под воздействием силы в 1 дн и равная

$$v_{\text{м}} = (6\pi\mu r_{\text{м}})^{-1},$$

где  $\mu$  — вязкость жидкости;  $r_{\text{м}}$  — радиус молекулы.

Таким образом, коэффициент диффузии в жидкости увеличивается с ростом температуры (эффект усиливается тем, что  $\mu$  с ростом температуры как правило уменьшается), снижением вязкости жидкости и уменьшением размеров молекул.

## 2.2.5. Кинетика сорбции

Хроматографический процесс в сильной степени зависит не только от равновесных характеристик сорбции, в частности коэффициентов Генри, но и от кинетики сорбции, т. е. скорости установления сорбционного равновесия. Если эта величина очень мала, много меньше скорости перемещения компонента вместе с потоком в продольном направлении, то процесс будет протекать в сильно неравновесных условиях и можно ожидать появления различного рода усложняющих факторов, таких как дополнительное размывание, асимметрия пиков.

Процесс сорбции состоит из трех стадий: миграции молекул сорбата из канала между частицами сорбента к поверхности частиц (внешний массообмен), диффузии внутрь зерна по системе пор в случае адсорбентов или внутрь пленки неподвижной фазы в случае абсорбции (внутренняя диффузия), собственно акта адсорбции. Последний обычно протекает значительно быстрее двух первых стадий и поэтому мало влияет на скорость всего сорбционного процесса, которая определяется скоростью наиболее медленной стадии.

Если такой стадией является внешний массообмен, то возникнет разность концентраций в подвижной фазе, концентрация вблизи оси канала  $C$  отличается от концентрации вблизи поверхности зерна  $C_n$ . После того как молекулы сорбата достигнут этой поверхности «включаются» быстрые стадии: диффузия внутрь зерна с адсорбцией в порах или адсорбция на поверхности жидкой пленки с последующей диффузией вглубь нее. Поскольку все эти стадии протекают очень быстро, практически мгновенно по сравнению с медленным внешним массообменом, концентрация  $C_n$  успевает придти в равновесие с концентрацией поглощенного вещества  $C_c$  и никакого градиента концентраций по радиусу зерна адсорбента или толщине пленки жидкости не успевает установиться — быстрая внутренняя диффузия выравнивает такие градиенты. Распределение концентраций будет таким, какое представлено на рис. 1.9, а, причем для линейной изотермы сорбции  $C_c = KC_n$ . Вследствие разности концентраций  $C - C_n$  возникнет некоторый поток вещества  $G$ , направленный при сорбции к зерну, а при десорбции от зерна. В случае сорбции  $(C - C_n) > 0$ . Поток  $G$  измеряется количеством вещества (в граммах или молях), переносимом через площадку в  $1 \text{ см}^2$  за 1 с. Количество вещества, поглощаемое всей сферой в едини-

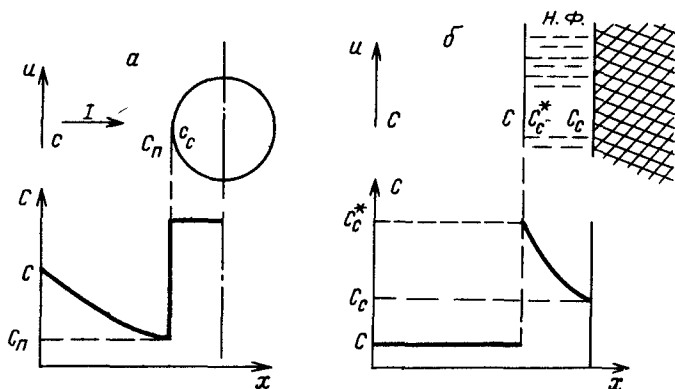


Рис. 1.9. Распределение концентраций при лимитирующей стадии внешнего (а) и внутреннего (б) массообмена

цу времени, составит  $GS_3$ , где  $S_3$  — поверхность сферы, а, соответственно, изменение концентрации внутри сферы будет равно  $GS_3/V_3$ , где  $V_3$  — объем сферы. Поскольку  $S_3 = \pi d_p^2$ ,  $V_3 = 1/6\pi d_p^3$ , это изменение концентрации за единицу времени равно  $6G/d_p$ , а за время  $dt$  —  $6Gdt/d_p$ . Таким образом,

$$dC_c = (6G/d_p) dt; \quad dC_c/dt = 6G/d_p. \quad (1.25)$$

Необходимо иметь в виду, что концентрации  $C$  и  $C_n$  непрерывно меняются во времени и соответственно меняется поток  $J$ , который можно принять постоянным только для малого интервала времени  $dt$ .

В неподвижной или ламинарно движущейся среде, как уже указывалось, поток вещества определяется только молекулярной диффузией и описывается первым законом Фика [см. уравнение (1.19)]. Для небольших градиентов концентрации величину  $dC/dx$  можно заменить разностями. Концентрация в среде меняются во времени и соответственно меняется поток  $G$ , который образованного зазорами между шарами, которые пропорциональны диаметру последних. Принимая, таким образом, радиус канала равным  $\nu d_p$ , где  $\nu$  — коэффициент пропорциональности, получим

$$G = D(C - C_n)/\nu d_p,$$

а после подстановки этого выражения в уравнение (1.25) найдем

$$dC_c/dt = 6D(C - C_n)/\nu d_p.$$

Если обозначить коэффициент перед скобкой через  $\beta$ , то выражение для внешнего массообмена записывается в виде

$$dC_c/dt = \beta(C - C_n); \quad (1.26)$$

в неподвижной или ламинарно движущейся среде можно принять

$$\beta = 6D/\nu d_p.$$

Если внешний массообмен протекает достаточно быстро, то концентрации в среде выравниваются, но возникает градиент концентрации в сорбированном состоянии. Например, в случае пленки неподвижной фазы, нанесенной на твердый носитель, в поверхностном слое пленки концентрация  $C_c^*$  будет равновесна с концентрацией в потоке  $C$ , а вблизи поверхности твердого носителя она будет отличаться от  $C_c^*$ : будет меньше при сорбции и больше при десорбции (рис. 1.9, б). Кинетическое уравнение при определяющей роли внутренней диффузии может быть формально записано по аналогии с уравнением (1.26):

$$dC_c/dt = \beta'(C_c^* - C_c). \quad (1.27)$$

В таком виде его часто используют для описания внутренней диффузии в адсорбентах, поскольку учесть сложную картину переноса вещества в порах обычно очень сложно.



В случае абсорбции перенос вещества внутри пленки неподвижной фазы описывается законом Фика:

$$\partial C_c / \partial t = D_{\text{ж}} \partial^2 C_c / \partial y^2. \quad (1.28)$$

где  $D_{\text{ж}}$  — коэффициент диффузии в пленку неподвижной фазы;  $y$  — координата в направлении внутрь пленки жидкости (пленка предполагается плоской)

Вторую производную, входящую в это уравнение, можно приближенно заменить конечными разностями  $(C_c^* - C_c) / d_l^2$ , где  $d_l$  — толщина пленки жидкости. Тогда из сопоставления уравнений (1.27) и (1.28) получим соотношение

$$\beta' = D_{\text{ж}} / d_l^2,$$

позволяющее представить феноменологическую константу  $\beta'$  через физические параметры.

Время пребывания молекулы в адсорбированном состоянии  $t_a$  в случае, когда лимитирующей стадией является внутренняя диффузия, в среднем равно удвоенному времени, необходимому для диффузии молекулы на толщину пленки неподвижной фазы. Это время нетрудно оценить с помощью уравнения Эйнштейна:

$$t_a = 2d_l^2 / 2D_{\text{ж}} = d_l^2 / D_{\text{ж}}. \quad (1.29)$$

Соответственно, время пребывания молекулы в десорбированном состоянии  $t_d$  равно

$$t_d = t_a / k' = d_l^2 / D_{\text{ж}} k'. \quad (1.30)$$

Последнее выражение справедливо при практически мгновенном выравнивании концентрации в подвижной фазе, когда внешним массообменом можно пренебречь. В реальных условиях часто сделать это нельзя и молекула, покинувшая неподвижную фазу, должна продиффундировать в ядро потока и обратно, прежде чем она снова может быть сорбирована. В итоге время пребывания в свободном состоянии  $t_d'$  оказывается большим, чем  $t_d$  на время внешней диффузии  $t_{\text{вн}}$ . Последнюю величину также можно оценить с помощью уравнения Эйнштейна, полагая, что путь внешней диффузии приближенно равен диаметру зерна сорбента

$$t_{\text{вн}} = d_p^2 / D.$$

В результате общее время пребывания в свободном состоянии составит

$$t_d' = d_p^2 / D + d_l^2 / D_{\text{ж}} k'. \quad (1.31)$$

Полученные выражения будут использованы в дальнейшем для описания размывания хроматографических пиков.

## 2.3. ЗАКОНОМЕРНОСТИ УДЕРЖИВАНИЯ

При проведении хроматографического разделения анализируемую смесь вводят импульсно в поток подвижной фазы, фильтрующей через слой сорбента, заполняющий колонку или нанесенный на пластину. Компоненты смеси потоком подвижной фазы перемещаются по колонке или пластине, причем в зависимости от сорбируемости они двигаются с разными скоростями и в результате разделяются. Поэтому ключевым вопросом является установление закономерностей, которым подчиняется скорость перемещения компонента.

### 2.3.1. Скорость перемещения компонентов

Введенный в колонну компонент частично сорбируется, причем, как указывалось в предыдущем разделе, происходит непрерывный обмен молекулами между сорбентом и подвижной фазой, так что каждая молекула часть времени находится в адсорбированном состоянии, а часть в подвижной фазе. Когда молекула вещества находится в подвижной фазе, она перемещается с той же скоростью, что и эта фаза, остальное время она неподвижна. Молекулу вещества можно уподобить, таким образом, частице, плывущей в потоке, скорость течения в котором равна, например, 10 см/с, но время от времени пристающей к берегу. Совершенно очевидно, что если частица будет находиться в движении половину всего времени, то ее скорость составит половину от скорости потока, т. е. 5 см/с, а если 0,1 всего времени, то 1 см/с. Иными словами, скорость перемещения частицы относится к скорости потока как время, в течение которого она находится в движении, ко всему интервалу времени. Переходя к компоненту смеси, можем по аналогии записать пропорцию:

$$\frac{\text{Скорость компонента}}{\text{Скорость подвижной фазы}} = \frac{\text{Время пребывания в потоке}}{\text{Общее время пребывания}}$$

или в буквенных обозначениях:

$$v/u = t_d / (t_a + t_d).$$

Правую часть записанного соотношения мы уже рассматривали [см. уравнение (I.16)]. Используя уравнение (I.16), получим:

$$v = uR = u / (1 + k') \quad (\text{I.32})$$

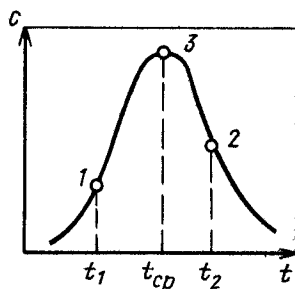
или используя выражение (I.14) для  $k'$

$$v = u\varepsilon / (\varepsilon + K\varkappa) = w / (\varepsilon + K\varkappa) = w / \Gamma. \quad (\text{I.33})$$

Полученное соотношение является одним из основных в хроматографии. Оно показывает, что скорость перемещения компонента прямо пропорциональна скорости подвижной фазы и уменьшается с увеличением сорбируемости компонента и

Рис. 1.10. Скорость перемещения по колонке отдельных молекул:

1 — быстрые молекулы ( $v=L/t_1$ ), 2 — медленные молекулы ( $v=L/t_2$ ), 3 — молекулы со средней скоростью



параметра  $\chi$ ; величины  $\omega$ ,  $\varepsilon$  и  $\chi$ , входящие в уравнение (1.33), одинаковы для всех компонентов разделяемой смеси; различие между компонентами сводится к различиям в значении истинного коэффициента Генри  $K$ . Именно за счет этого различия компоненты смеси двигаются с разными скоростями, что и приводит к разделению: слабо сорбирующиеся компоненты с низкими значениями  $K$  перемещаются быстро и опережают сильно сорбирующиеся компоненты с высокими значениями  $K$ .

Пики в хроматографии имеют вид колоколообразных кривых, т. е. молекулы одного и того же компонента покидают колонку в разное время; при условии одновременного ввода это означает, что разные молекулы двигаются по колонке с разными скоростями (рис. 1.10). Это связано со случайным характером перемещения индивидуальной молекулы. Если создать ламинарный поток, то его регулярная скорость  $u$  наложится на хаотическое движение молекул, но сам характер этого движения не изменится. По истечении некоторого времени часть молекул обгонит поток, часть отстанет от него, но если подсчитать среднюю скорость молекул  $u_{cp}$ , то она будет в точности равна  $u$ , поскольку опережения и отставания равновероятны и при подсчете среднего значения должны скомпенсировать друг друга.

Более сложная картина наблюдается при фильтрации потока через зернистый слой. В этом случае дополнительная хаотичность возникает из-за перемещения потока по системе каналов с разной длиной, направлением и скоростью движения в каждом канале, вследствие чего возможно блуждание индивидуальных молекул, обгоняющих или отстающих от потока в целом. Сама скорость  $u$  является лишь средней величиной и может сильно отличаться от значений локальных скоростей, наблюдающихся в разных точках насадки. Эта хаотичность в системе каналов усилит хаотичность теплового молекулярного движения, но не изменит его сути, при этом средняя скорость движения молекул  $u_{cp}$  по-прежнему равна  $u$ .

Еще более усложняет картину процесс сорбции, замедляющий движение молекул. Когда подсчитывают долю времени, которую молекула проводит в неподвижном состоянии, и связывают

ее с величиной  $k'$ , то следует помнить, что речь опять-таки идет только о средней величине: индивидуальная молекула может пребывать в сорбированном состоянии и быть неподвижной больший или меньший отрезок времени, это случайный процесс, продолжительность которого невозможно определить заранее. В итоге хаотичность движения молекул еще более возрастает: за счет разброса во временах  $t_a$  и  $t_d$  некоторые молекулы будут иногда двигаться со скоростью, большей  $uR$ , иногда меньшей, причем быстрые молекулы могут затем отстать и их обгонят ранее отстававшие.

Таким образом, и в этом случае картина мало отличается от случайных блужданий под влиянием теплового движения, скорость  $v$ , определяемая выражениями (I.32) и (I.33), является лишь средней величиной, вокруг которой разбросаны значения скоростей индивидуальных молекул.

Итак, процессы в хроматографической колонке носят статистический характер, причем на скорость перемещения индивидуальной молекулы, ее положение в колонке оказывает влияние большое число малых факторов. Все эти накладывающиеся друг на друга и независимые процессы по результирующему эффекту подобны обычной молекулярной диффузии и должны приводить к распределениям, описываемым нормальным законом (I.17). Пусть по истечении времени  $t$  распределение концентраций на слое сорбента описывается этим законом. Участок слоя сорбента, занятый компонентом, будем называть зоной. Если поделить все величины  $x$ , отложенные по оси абсцисс, на время  $t$ , т. е. перейти от распределения пространственных координат к распределению скоростей, то общий характер зависимости не изменится, поскольку такое преобразование равносильно изменению масштаба. В случае нормального распределения среднее значение величины, в данном случае скорости, соответствует максимуму кривой, совпадающему с центром зоны.

Таким образом, приходим к выводу, что именно максимум зоны двигается с равновесной скоростью  $v$ , определяемой уравнением (I.33). Когда зона подойдет к концу колонки, она начнет вымываться в детектор, причем скорость этого вымывания будет также равна  $v$ .

Если поделить все величины  $x$  на скорость  $v$ , то перейдем к кривой  $C=f(t)$ , которую фиксирует детектор и которую называют пиком. По аналогии с предыдущим можно сказать, что только одна точка, точка максимума пика, перемещается с равновесной скоростью, определяемой уравнениями (I.33). Точки, расположенные на переднем фронте пика, двигаются быстрее, а на заднем фронте — медленнее, чем максимум пика. Таким образом, скорость  $v$ , определяемая соотношениями (I.33), является средней скоростью, с которой перемещаются некоторые молекулы. Скорости остальных разбросаны вокруг этого среднего значения.

Однако наличие максимума пика, который легко обнаружить на хроматограмме, перемещающегося со скоростью, зависящей от равновесной характеристики  $K$ , обеспечивает идентификацию компонентов смеси. Такая идентификация основана на понятии объема удерживания.

### 2.3.2. Абсолютный объем удерживания

С помощью секундомера или измеряя отрезки на диаграммной ленте, можно определить время от момента ввода смеси в хроматограф до выхода максимума данного пика  $t_m$ . Учитывая, что расстояние, пройденное компонентом, равно длине колонки  $L$ , нетрудно получить соотношение для  $t_m$ :

$$t_m = L/v = L(\varepsilon + \kappa K)/w \quad (I\ 34)$$

Умножим числитель и знаменатель этого соотношения на сечение колонки  $S_{\text{кол}}$ . Величина  $S_{\text{кол}}w = W$  — расходу подвижной фазы через колонку;  $L\varepsilon S_{\text{кол}} = V_0$  — свободному объему колонки;  $\kappa LS_{\text{кол}} = V_c$  — объему сорбента в колонке. С учетом этих обозначений перепишем выражение для  $t_m$  в виде

$$t_m = V_0/W + V_c K/W$$

Отношение  $V_0/W$  равно времени удерживания несорбирующегося компонента  $t_0$ . Переносим  $t_0$  в левую часть, получим

$$t_R = t_m - t_0 = V_c K/W \quad (I\ 35)$$

Величину  $t_R$  называют приведенным временем удерживания. Экспериментально она получается как разность между временем удерживания данного и несорбирующегося компонента. Последнее можно определить, дозируя в хроматограф компоненты, сорбция которых пренебрежимо мала в условиях проведения эксперимента. Например, в газожидкостной хроматографии в качестве таких компонентов часто применяют воздух (при работе с детектором по теплопроводности) или метан (при работе с пламенно-ионизационным детектором). Имеются также экстраполяционные и расчетные методы нахождения  $t_0$ .

От времени удерживания целесообразно перейти к объему удерживания  $V_R$ .

$$V_R = t_R W = V_c K$$

Как видно из этого соотношения, приведенный объем удерживания — это объем подвижной фазы, пропущенный через колонку за время от момента выхода максимума пика несорбирующегося компонента до момента выхода максимума пика данного компонента. По аналогии с  $t_m$  можно говорить и о соответствующем объеме удерживания

$$V_m = t_m W,$$

при этом

$$V_R = V_m - V_0.$$

Если представить  $V_c$  в виде

$$V_c = m/\rho_c,$$

где  $m$  — масса адсорбента (неподвижной фазы) в колонке;  $\rho_c$  — плотность неподвижной фазы (адсорбента),

то можно получить удельный объем удерживания:

$$V_{уд} = V_R/m = K/\rho_c.$$

Эта величина является отношением двух физико-химических констант: истинного коэффициента Генри и плотности сорбента или неподвижной фазы и потому сама является физико-химической константой; она зависит только от природы сорбента и сорбата и температуры. В принципе, можно было бы составить таблицы значений  $V_{уд}$  для разных веществ на разных сорбентах и с их помощью проводить идентификацию веществ. Ранее полученные характеристики удерживания  $t_m$ ,  $t_R$  и  $V_R$  не являются физико-химическими характеристиками, так как зависят от условий проведения анализа. Так,  $V_R$  зависит от количества сорбента в колонке, т. е. от размеров последней, плотности упаковки сорбента в колонке, содержания неподвижной фазы на твердом носителе. Величина  $t_R$  зависит кроме перечисленных факторов также и от расхода элюента, а  $t_m$  — от «мертвого» объема систем, в который кроме «свободного» объема самой колонки  $V_0$  входят и объемы соединительных коммуникаций. Таким образом, только величина  $V_{уд}$  является физико-химической константой, не зависящей от условий разделения.

Следует иметь в виду, однако, что в уравнении (I.34) под  $w$  понималась средняя по колонке фиктивная скорость элюента. В жидкостной хроматографии из-за крайне малой сжимаемости элюента и работы при комнатной температуре скорость элюента остается практически постоянной вдоль всего жидкостного тракта от системы ввода до детектора. Поэтому переход от измеряемых величин  $t_m$  и  $t_0$  к  $V_{уд}$  относительно прост:

$$V_{уд} = (t_m - t_0) W/m.$$

Для подсчета  $V_{уд}$  необходимо знать массу сорбента в колонке и расход элюента на выходе из хроматографа. Сложнее обстоит дело в газовой хроматографии из-за сжимаемости газа и работы, как правило, при повышенных температурах. Скорость газа на выходе из колонки  $w_0$  связана со средней скоростью полученным ранее соотношением

$$w = w_0 f.$$

Кроме того, расход газа измеряют обычно не сразу на выходе

колонки, а за пределами термостата при комнатной температуре. Объем газов, а следовательно, и их расход связаны с температурой соотношением

$$w_1/w_2 = T_1/T_2.$$

Если скорость  $w_0$  соответствует температуре колонки  $T$ , а  $w_{00}$  — измеряемая скорость при комнатной температуре  $T_K$ , то

$$w_0 = w_{00} (T/T_K).$$

Наконец, следует учесть, что давление на выходе колонки  $P_0$  может отличаться от давления в расходомере  $P_H$ , при этом

$$w_0 = w_{00} P_H / P_0,$$

с учетом этого

$$V_{уд} = (t_m - t_0) (w_{00}/m) f(T/T_K) (P_H/P_0).$$

В этом выражении  $P_H$  равно барометрическому, если расходомер открыт на атмосферу. Однако в газовой хроматографии расход чаще всего измеряют пенным измерителем, содержащим воду, поэтому давление  $P_H$  складывается не только из давления газаносителя, но и давления насыщенных паров воды  $P_B$ . Последнюю величину следует вычесть из давления  $P_H$ , чтобы перейти к чистому газу-носителю. Окончательно получаем:

$$V_{уд} = (t_m - t_0) (w_{00}/m) f(T/T_K) (P_H - P_B) / P_0.$$

При физико-химических расчетах удельный удерживаемый объем приводят к нормальным условиям, т. е. к 273 К. Эту величину называют абсолютным удельным удерживаемым объемом:

$$V_{уд.аб} = V_{уд} (273/T).$$

Хотя вычисленную таким образом величину можно применять для целей идентификации с помощью соответствующих таблиц, возникают существенные трудности при их составлении, а главное, при определении  $V_{уд}$  на стандартной хроматографической аппаратуре. Как видно из записанных формул, надо с большой точностью измерять расход элюента и температуру, давление на входе и выходе колонки, знать массу сорбента в колонке. Большинство стандартных аналитических хроматографов не имеет некоторых необходимых измерительных приборов, например точных манометров непосредственно на входе и выходе колонки, а термостат колонок может обладать значительными температурными градиентами, в результате чего измеряемая температура может несколько отличаться от эффективной. Не всегда можно точно установить и массу сорбента в колонке. Поэтому абсолютными величинами удерживания пользуются преимущественно при определении физико-химических констант, характеризующих адсорбцию и растворение, при этом измерения

проводят на специальном более точном оборудовании. Например, на основании измерения абсолютных удельных объемов удерживания нетрудно определить коэффициенты Генри, а по ним коэффициенты активности при бесконечном разбавлении, являющиеся важнейшими физико-химическими константами в теории растворов. В аналитической же практике для целей идентификации пользуются относительными и интерполяционными величинами удерживания.

### 2.3.3. Относительные характеристики удерживания. Индексы удерживания

Относительный объем удерживания  $V_{\text{отн}}$  представляет собой отношение приведенных объемов удерживания определяемого вещества и стандарта:

$$V_{\text{отн}} = V_{R,x}/V_{R,\text{ст}} = t_{R,x}/t_{R,\text{ст}}$$

Очень часто за стандарт принимают один из компонентов смеси. Относительные объемы удерживания позволяют при этом наглядно представить себе относительное расположение пиков на хроматограмме. Для определения относительных объемов удерживания не требуется точного измерения многих параметров, в том числе и массы адсорбента или неподвижной фазы в колонке: эти массы, поправки на перепад давления, расходы подвижной фазы входят в выражение для  $V_R$  в виде сомножителей и при вычислении отношения приведенных объемов удерживания сокращаются. Влияние температуры на это отношение значительно слабее, чем на абсолютные объемы удерживания.

Однако табулирование значений  $V_{\text{отн}}$  с целью идентификации вызывает сложности из-за выбора стандарта. Попытки выбрать один стандарт (в газовой хроматографии рекомендовали, например, *n*-нонан) приводят к трудностям, поскольку всегда желательно, чтобы приведенные объемы удерживания определяемого вещества и стандарта были близкими, добиться же этого при едином стандарте невозможно. Легкокипящие вещества элюируют значительно быстрее нонана и даже бывает трудно получить его пик за приемлемое время при температурах, близких к комнатной; наоборот, при анализе высококипящих веществ нонан элюирует слишком быстро и точность измерения  $V_{R,\text{ст}}$  оказывается очень низкой. Поэтому в газовой хроматографии для целей идентификации применяют, как правило, интерполяционные характеристики и прежде всего индекс удерживания  $I$ , [19].

Предположим, что определили значения  $V_R$  для ряда нормальных углеводородов и построили график зависимости  $\lg V_R$  от числа атомов углерода в молекуле  $z$ , который представляет собой прямую линию (рис. I.11). Далее можно отложить на оси ординат  $\lg V_{R,x}$  и с помощью графика найти некоторое значение



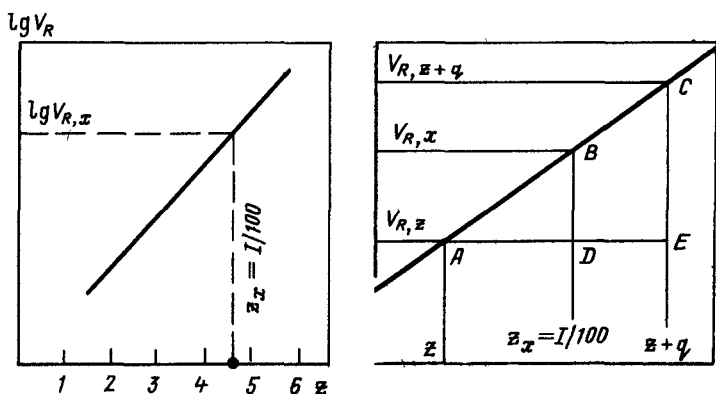


Рис. 1.11. К определению индекса удерживания

$z_x$  (в общем случае, конечно, дробное), которое соответствует  $V_{R,x}$ . Обычно  $z_x$  определяют с точностью до сотых долей, поэтому чтобы не оперировать с дробями, найденное значение  $z_x$  умножают на 100. Это и есть индекс удерживания  $I = 100 z_x$ . Таким образом, можно дать следующее определение индекса удерживания: индекс удерживания — это умноженное на 100 число атомов углерода гипотетического нормального парафина, имеющего объем удерживания такой же, как и данное соединение.

Введение индексов удерживания позволяет избежать трудностей, связанных с использованием единого стандарта, поскольку для каждого соединения в качестве сравнения берут те углеводороды, которые элюируют в непосредственной близости от него. Вместе с тем шкала индексов является единой, поскольку в конечном итоге основой этой шкалы является единая зависимость  $\lg V_R - z$  для углеводородов. Если, например, индекс соединения равен 534, то ясно, что оно элюирует между пентаном и гексаном, ближе к пентану, а если 1250, то между до- и тридеканом.

Обычно индекс рассчитывают не графически, а применяя интерполяционную формулу. На рис. 1.11 приведена схема, поясняющая способ получения такой формулы. Здесь  $V_{R,z}$  — объем удерживания углеводорода с числом атомов углерода  $z$ , который элюирует быстрее исследуемого соединения, а  $V_{R,z+q}$  — объем удерживания углеводорода с числом атомов углерода  $z+q$ , элюирующего медленнее исследуемого соединения. Из подобия треугольников  $ACE$  и  $ABD$  можно составить пропорцию  $CE/BD = AE/AD$  или

$$\frac{\lg V_{R,z+q} - \lg V_{R,z}}{\lg V_{R,x} - \lg V_{R,z}} = \frac{(z+q) - z}{(I/100) - z}.$$

Из последнего уравнения легко выразить  $I$

$$I = 100z + 100q (\lg V_{R,x} - \lg V_{R,z}) / (\lg V_{R,z+q} - \lg V_{R,z}) \quad (1.36)$$

Обычно стараются в качестве соединений сравнения взять соседние члены гомологического ряда, так что  $q = 1$ . Тогда

$$I = 100 \left( z + \frac{\lg V_{R,x} - \lg V_{R,z}}{\lg V_{R,z+1} - \lg V_{R,z}} \right) = 100 \left( z + \lg \frac{V_{R,x}}{V_{R,z}} / \lg \frac{V_{R,z+1}}{V_{R,z}} \right)$$

Индексы удерживания сводят в таблицы, которые приводят в справочниках и учебниках, их применение облегчает идентификацию компонентов. Индексы удерживания, как и относительные объемы удерживания, не зависят от неточностей в измерении расхода подвижной фазы, массы сорбента в колонке сравнительно мало чувствительны к изменению температуры, при их использовании не требуется введение поправки на перепад давления.

В жидкостной молекулярной хроматографии систему индексов удерживания обычно не используют и для характеристики удерживания чаще всего применяют величину [20]

$$k' = t_R / t_0$$

Неудобство в ее применении связано с необходимостью точного измерения  $t_0$ , которое входит в виде делителя и поэтому сильно влияет на  $k'$ . Напомним, что в описанных выше параметрах удерживания  $t_0$  вычитали из  $t_m$ . Поскольку обычно  $t_m \gg t_0$ , неточность в измерении  $t_0$  слабо влияла на параметры удерживания.

В тонкослойной хроматографии, как уже описывалось, удерживание несорбирующегося компонента не определяют, а обычно измеряют два отрезка: расстояние от линии старта до центра пятна  $l_k$  и до фронта растворителя  $l_0$ . Основным показателем удерживания является отношение этих величин [21]

$$R_f = l_k / l_0,$$

которое меньше 1 и по смыслу аналогично величине  $R$ , будучи таким же образом связано с  $k'$ .

К сожалению, из-за плохой воспроизводимости адсорбентов величины  $R_f$  и  $k'$  не табулируются и применяются для целей идентификации менее широко, чем индексы удерживания в газовой хроматографии.

### 2.3.4. Механизм удерживания

В газовой хроматографии подвижная фаза чаще всего не участвует в сорбции и разделении, ее функция заключается только в переносе компонентов вдоль слоя сорбента. Исключения составляют некоторые редко применяющиеся разновидности

хроматографии, где в качестве подвижной фазы используют пары ряда веществ, чаще всего воды. Обычно же характер удерживания определяется исключительно природой применяемых адсорбентов или неподвижных фаз.

Среди адсорбентов и неподвижных фаз выделим прежде всего неполярные, способные только к дисперсионным взаимодействиям. К ним относят углеродные и некоторые полимерные сорбенты, углеводородные (сквалан, апиезоны) и метилсиликоновые неподвижные фазы. Неполярные сорбаты сильнее всего удерживаются на неполярных сорбентах за счет сильных дисперсионных взаимодействий; полярные сорбаты при этом удерживаются слабее, во всяком случае, при сопоставлении с неполярными, имеющими близкие температуры кипения. Это связано с тем, что температуры кипения полярных веществ определяются не столько дисперсионными, сколько дипольными взаимодействиями между их молекулами или даже водородными связями, которые при сорбции на неполярных сорбентах никак не проявляются. Самый яркий пример — вода. Ее высокая температура кипения обусловлена почти целиком водородными связями, а почти та же самая температура кипения гептана — дисперсионными взаимодействиями. Ясно, что при разделении на неполярном сорбенте, например, графитированной саже, вода будет удерживаться очень слабо, а гептан сильно. Способность к дисперсионному взаимодействию увеличивается с ростом молекулярной массы, поскольку при этом возрастает число фрагментов молекулы, участвующих во взаимодействии. Количественным показателем способности к дисперсионному взаимодействию является также поляризуемость молекулы.

При переходе к полярным сорбентам получается обратная картина: резко усиливается удерживание полярных и способных к специфическим взаимодействиям сорбатов и ослабляется удерживание неполярных. Одним из показателей способности молекулы удерживаться на полярных сорбентах является ее дипольный момент и связанная с ним диэлектрическая проницаемость.

В жидкостной хроматографии подвижная фаза самым активным образом влияет на удерживание и разделение [22]. Во-первых, межмолекулярные взаимодействия между подвижной фазой и сорбентом препятствуют сорбции последнего и уменьшают удерживание. Во-вторых, молекулы подвижной фазы всегда сорбируются на поверхности адсорбента и вытесняются с этой поверхности молекулами сорбата или сорбция последних происходит не на чистой поверхности адсорбента, а поверх адсорбированных молекул подвижной фазы. Путем варьирования природы подвижной фазы, применения смешанных растворителей и различных добавок удастся в широких пределах менять удерживание, в связи с чем отпадает необходимость в широком наборе адсорбентов. Для подавляющего числа рутинных анализов можно

ограничиться двумя видами адсорбентов: полярным, в качестве которого чаще всего используют силикагель, и неполярным — кремнеземной матрицей, покрытой длинными углеводородными радикалами  $C_8$  или  $C_{18}$ . Хроматографию на полярных адсорбентах называют нормально-фазной, а на неполярных — обращенно-фазной.

На полярных адсорбентах и неполярных элюентах (гексан) полярные вещества удерживаются очень сильно за счет специфических взаимодействий с адсорбентом, и такие системы для подобных разделений, как правило, не используют. Неполярные вещества, наоборот, отличаются сильным дисперсионным взаимодействием с подвижной фазой и значительно более слабым с адсорбентом и поэтому удерживаются слабо. Подходящее удерживание и удовлетворительное разделение получают для ароматических углеводородов, способных к специфическому, но не слишком сильному взаимодействию с полярным адсорбентом. Например, хорошо делятся полиметил- и алкилбензолы, причем с увеличением числа метильных заместителей в бензольном кольце электронная плотность последнего увеличивается и удерживание возрастает, а с увеличением длины алкильной цепи в алкилбензолах, наоборот, падает, так как при этом возрастает неспецифическое взаимодействие с подвижной фазой. Для разделения более полярных веществ за приемлемое время увеличивают полярность подвижной фазы, добавляя в гексан хлороформ, метиленхлорид, небольшие количества спирта. С увеличением полярности подвижной фазы удерживание полярных веществ уменьшается, а неполярных увеличивается.

При разделениях на неполярных адсорбентах чаще всего применяют полярные подвижные фазы: смеси воды со спиртами или ацетонитрилом. В этом случае наиболее сильно удерживаются малополярные вещества, способные к сильному дисперсионному взаимодействию с адсорбентом и слабо взаимодействующие с подвижной фазой; уменьшение полярности последней сокращает время анализа. Наоборот, полярные вещества слабо удерживаются обращенно-фазной системой и часто могут не разделяться; в этом случае снижение полярности подвижной фазы увеличивает удерживание и может способствовать разделению полярных веществ.

Более подробно связь межмолекулярных взаимодействий с удерживанием и разделением будет рассмотрена в разделах, посвященных различным видам хроматографии.

При сорбции молекул происходит, таким образом, изменение энергии их взаимодействия с окружающими молекулами. Это изменение трактуется в термодинамике как изменение свободной энергии системы  $\Delta G$ , которое связано с константой Генри простым соотношением

$$\Delta G = RT \ln K \quad (I\ 37)$$

Записанное равенство является основой многих хроматографических расчетов.

### 2.3.5. Селективность

Под селективностью в самом общем смысле понимают способность хроматографической системы (сорбента и подвижной фазы) делить данную пару соединений. Как видно из изложенного в предыдущих разделах, роль хроматографической системы сводится прежде всего к тому, чтобы обеспечить различие в скоростях перемещения компонентов. Чем больше это различие, тем сильнее раздвинуты максимумы пиков или пятна на пластине и тем лучше их разделение. Поэтому представляется логичным в качестве меры селективности использовать отношение скоростей перемещения компонентов  $\alpha_k$

$$\alpha_k = v_1/v_2 = t_{m2}/t_{m1},$$

которое после подстановки значений  $t_{m1}$  и  $t_{m2}$  согласно уравнению (I.34) можно переписать в виде

$$\alpha_k = (\varepsilon + \kappa K_2) / (\varepsilon + \kappa K_1) \quad (I.38)$$

Этот коэффициент, который мы назовем коэффициентом разделения колонки, меняется от 1 (разделение отсутствует,  $K_1 = K_2$ ) до  $\infty$ . Поэтому часто применяют производный коэффициент селективности колонки

$$\Phi_k = (\alpha_k - 1) / (\alpha_k + 1),$$

имеющий более удобные пределы изменения от 0 до 1. После подстановки в последнее равенство выражения (I.38) это равенство приобретает вид

$$\Phi_k = \kappa (K_2 - K_1) / [2\varepsilon + \kappa (K_1 + K_2)] \quad (I.39)$$

Оба коэффициента  $\alpha_k$  и  $\Phi_k$  определяются не только термодинамическими величинами  $K_1$  и  $K_2$ , но и параметрами хроматографической насадки  $\varepsilon$  и  $\kappa$ . Другими словами, они зависят от процента нанесения неподвижной фазы и от плотности упаковки сорбента в колонке. Благодаря этой зависимости при уменьшении количества неподвижной фазы, приводящем к снижению  $\kappa$ , коэффициенты  $\Phi_k$  и  $\alpha_k$ , начиная с определенного предела, когда произведение  $\kappa K_i$  станет сопоставимым с  $\varepsilon$ , начнут уменьшаться и при  $\kappa \rightarrow 0$   $\alpha_k \rightarrow 1$ , а  $\Phi_k \rightarrow 0$ . По этой причине капиллярные колонки, характеризующиеся малыми значениями  $\kappa$  по сравнению с насадочными, отличаются от последних и более низкой селективностью. Коэффициенты  $\alpha_k$  и  $\Phi_k$  непосредственно связаны с разделением пиков и в этом их преимущество. Однако они определяются не только подбором неподвижной фазы или адсорбента (в ВЭЖХ и ТСХ системы адсорбент — подвижная

фаза), но и организацией самой хроматографической колонки, что и нашло отражение в названии этих коэффициентов.

Нередко представляет интерес селективность самой неподвижной фазы или адсорбента безотносительно к их упаковке, проценту нанесения, типу колонки. В качестве меры такой селективности можно использовать отношение истинных коэффициентов Генри

$$\alpha = K_2/K_1 = k'_2/k'_1 = t_{R2}/t_{R1}.$$

В эквивалентности второго и третьего равенства первому легко убедиться, обратившись к соотношениям (1.14) и (1.35). Третье равенство применяют для расчета  $\alpha$  по результатам хроматографического эксперимента. Коэффициент  $\alpha$ , который в дальнейшем будем называть просто коэффициентом разделения, имеет те же пределы изменения, что и  $\alpha_k$ , поэтому кроме него вводят производный коэффициент селективности

$$\Phi = (\alpha - 1) / (\alpha + 1).$$

Коэффициент  $\alpha$  является чисто термодинамической величиной и характеризует различие в энергии межмолекулярного взаимодействия между сорбентом и данными компонентами. Записывая уравнение (1.37) для обоих компонентов и вычитая одно из другого, получим

$$\Delta G_2 - \Delta G_1 = \Delta(\Delta G) = -RT \ln(K_2/K_1) = -RT \ln \alpha.$$

Нетрудно установить связь между коэффициентом  $\Phi_k$  и  $\Phi$ . После деления числителя и знаменателя выражения (1.39) на  $\kappa K_1$ , получим

$$\Phi_k = \frac{\alpha - 1}{2\kappa/\alpha K_1 + (\alpha + 1)} = \frac{\alpha - 1}{\alpha + 1} \left( \frac{2}{k'_1(\alpha + 1)} + 1 \right)^{-1}.$$

Поскольку  $\alpha = k'_2/k'_1$ , то  $k'_1(\alpha + 1) = k'_2 + k'_1$ . Обозначим среднее арифметическое  $(k'_2 + k'_1)/2$  через  $k'$ , тогда последнее выражение можно переписать в виде

$$\Phi_k = \frac{\alpha - 1}{\alpha + 1} \frac{1}{1/k' + 1} = \Phi \frac{k'}{1 + k'}. \quad (1.40)$$

Это равенство устанавливает соотношение между  $\Phi_k$  и  $\Phi$ . В то время как  $\alpha$  и  $\Phi$  зависят только от отношения коэффициентов Генри разделяемых веществ, т. е. только от различия в межмолекулярных взаимодействиях, коэффициент  $\Phi_k$  зависит и от общей сорбируемости на данной насадке. Для данной пары веществ и выбранной неподвижной фазы  $\alpha$  и  $\Phi$  величины постоянные; с уменьшением процента пропитки твердого носителя неподвижной фазой эти величины не меняются, а при  $\kappa = 0$  становятся равными  $\alpha = 1$ ,  $\Phi = 0$ . В отличие от  $\alpha$  и  $\Phi$  коэффициенты  $\alpha_k$  и  $\Phi_k$  зависят от  $\kappa$  и только при больших  $k'$  (большие  $\kappa$

или  $K$ ) эта зависимость пропадает. Ниже приведены значения  $k'/(1+k')$  при разных  $k'$ , которые характеризуют отношение  $\Phi_k/\Phi$ :

$k \dots \dots \dots$	0,1	0,5	1	2	5	10
$k/(1+k') \dots$	0,09	0,33	0,5	0,66	0,83	0,91

Видно, что  $\Phi_k$  может значительно отличаться от  $\Phi$ , приближаясь к последней только при  $k' > 5$ . Соотношение (1.40) показывает, что для разделения данной пары веществ имеет значение не только различие в межмолекулярных взаимодействиях, но и интенсивность этих взаимодействий, характеризующая членом  $k'/(1+k')$ .

## 2.4. РАЗМЫВАНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ПИКОВ

Различие в сорбируемости разделяемых компонентов, которое существует всегда (нет двух компонентов с совершенно одинаковой сорбируемостью), приводит к различию в скорости их перемещения вдоль слоя сорбента. Поэтому, если компоненты смеси вводятся одновременно в хроматографическую колонку, покидать ее они будут в разное время, т. е. будет наблюдаться эффект разделения смеси на отдельные компоненты. Если бы этот фактор был единственным, всегда наблюдалось бы разделение. К сожалению, кроме различия в сорбируемости, приводящего к разделению, в любой хроматографической системе действуют отрицательные факторы, вызывающие размывание, уширение полос разделяемых компонентов. Из-за этого размывания полосы наползают друг на друга, частично друг друга перекрывают, что ухудшает разделение. При небольшой разнице в сорбируемости, когда полосы в конце слоя сорбента находятся близко друг от друга или покидают колонку с небольшим интервалом времени, размывание может привести к полному перекрыванию полос, так что эффект разделения не будет наблюдаться визуально (рис. 1.12).

В разд. 2.2 были кратко описаны размывающие факторы. Сейчас мы рассмотрим их более подробно и количественно. При этом часто будет использоваться уравнение (1.18) для  $\sigma^2$ . Хотя размывающие факторы в хроматографии имеют самую различную природу, все они связаны со случайными блужданиями молекул в пространстве, сопровождающимися изменением направления и скорости их движения, очень схожими с тепловым движением молекул. Поэтому количественные закономерности этих процессов во многом совпадают с закономерностями молекулярной диффузии, в частности, как уже говорилось, они приводят к распределению концентраций, описываемому уравнением Гаусса, и их интенсивность может быть охарактеризована коэффициентом, аналогичным коэффициенту диффузии и называемому

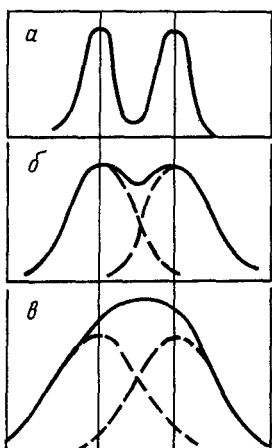


Рис. 112. Влияние размывания на разделение при одинаковом значении  $\alpha$ :

*а* — слабое размывание, полное разделение, *б* — сильное размывание, плохое разделение, *в* — очень сильное размывание, разделение отсутствует. Сплошная линия — суммарная концентрация, пунктирная — концентрации отдельных компонентов

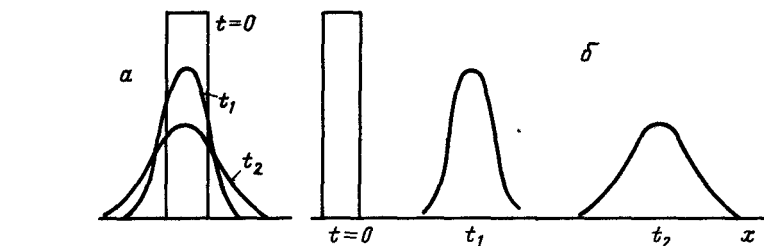


Рис. 113. Профили концентраций в последующие моменты времени в неподвижной среде (*а*) и ламинарно движущемся потоке (*б*)

эффективным коэффициентом диффузии. Поскольку коэффициент диффузии является достаточно простой величиной, мы вначале получим выражения для эффективных коэффициентов диффузии  $D_{эф}$  различных размывающих факторов, а уже потом перейдем к описанию этих факторов через более сложное понятие высоты, эквивалентной теоретической тарелке.

Установим прежде всего связь между коэффициентом диффузии и  $\sigma^2$ . Обратимся к уравнению кривой Гаусса (1.21) и преобразуем его применительно к процессу в хроматографической колонке. Будем считать, что это уравнение описывает распределение концентраций на слое сорбента в конце колонки. В этом случае под временем следует понимать время

$$t_m = L/v = L(1+k')/u.$$

Кроме того, следует учитывать, что при диффузии через сорбирующую среду коэффициент диффузии  $D$  уменьшается в  $(1+k')$  раз, поскольку диффузия происходит только тогда, когда компонент находится в подвижной фазе (диффузией молекул в сорбированном состоянии пренебрегаем). Доля этого времени как раз и составляет  $1/(1+k')$  от общего времени процесса  $t_m$ .



С учетом этих замечаний показатель экспоненты в уравнении (I.21) запишется в виде  $-x^2u/4DL$ . Сравнивая с уравнением (I.17), получим

$$\sigma^2 = 2DL/u \quad \text{или} \quad D = \sigma^2 u / 2L. \quad (\text{I.41})$$

Перейдем теперь к описанию основных факторов размывания.

### 2.4.1. Основные факторы размывания

Первым и наиболее универсальным из этих факторов является молекулярная диффузия, вызывающая размывание любого концентрационного профиля, например прямоугольного, и постепенно придающая ему форму кривой Гаусса. Ситуация, изображенная на рис. I.13, а, практически не изменится, если концентрационный профиль будет перемещаться ламинарным газовым или жидкостным потоком вдоль трубки: центр тяжести полосы, ее максимум будет двигаться со скоростью потока  $u$ , а размывание полосы относительно максимума описываться тем же законом (I.21), как показано на рис. I.13, б. Другими словами, если совместить начало координат с абсциссой центра тяжести полосы и перемещать его со скоростью  $u$ , то закономерности размывания окажутся одинаковыми в неподвижном и движущемся профиле концентраций (если пренебречь параболическим распределением скоростей по радиусу трубки). Положение несколько изменится при засыпке в трубку гранул. В этом случае диффузия протекает в извилистых каналах, образованных зернами сорбента, средняя протяженность которых на участке трубки длиной  $\Delta x$  равна  $l$ .

Предположим, что мы наблюдаем размывание полосы окрашенного вещества в стеклянной трубке, заполненной битым стеклом. Вследствие развития реального процесса в длинных извилистых каналах, процесс будет представляться замедленным, т. е. протекающим с меньшим коэффициентом диффузии  $D_{\text{мол}} < D$ . Для количественной характеристики наблюдаемого и интересующего нас процесса (нас интересует размывание полосы на колонке, а не вдоль канала) вводят коэффициент извилистости

$$\gamma = \Delta x / l.$$

Тогда

$$D_{\text{мол}} = \gamma D. \quad (\text{I.42})$$

Во многих случаях влияние молекулярной диффузии очень мало, например в жидкостной (мало  $D$ ) или при больших скоростях в газовой хроматографии. Однако этот фактор универсальный, он действует в насадочных и капиллярных колонках, в случае сорбирующихся и несорбирующихся компонентов, в потоке и неподвижной среде.

Вторым размывающим фактором, действующим только в на-

садочных колонках при наличии фильтрующегося через них потока, является вихревая или турбулентная диффузия. Ее возникновение связывают с тем, что разные молекулы перемещаются в зернистом слое по различным каналам, скорости потока в которых также различны, при этом каждая отдельная молекула то опережает поток,двигающийся со средней скоростью  $u$ , то отстает от него. Эти случайные блуждания приводят к размыванию концентрационного профиля.

Пусть скорость молекулы в очередном канале равна  $u$  и отличается от средней на величину  $\Delta u$ . Тогда, двигаясь по каналу, молекула сместится относительно потока на величину  $l = \Delta u t_l$ , где  $t_l$  — время движения по каналу. Будем считать, что длина канала приблизительно равна диаметру зерна  $d_p$ . Миновав зерно, молекула попадает в новый канал с новым значением скорости. Среднее время перемещения по одному каналу можно оценить как

$$t_l = d_p / u,$$

откуда

$$l = d_p \Delta u / u.$$

Очевидно, число таких скачков  $n_f$  равно общему пути миграции  $L$ , деленному на диаметр зерна  $d_p$ :

$$n_f = L / d_p.$$

Подстановка таких значений  $l$  и  $n_f$  в формулу (I.18) дает

$$\sigma^2 = (\Delta u / u)^2 d_p L,$$

откуда с учетом формулы (I.41) получим

$$D_{\text{вихр}} = 1/2 (\Delta u / u)^2 d_p u = \lambda d_p u, \quad (\text{I.43})$$

где  $\lambda$  — коэффициент упаковки, характеризующий правильность укладки зерен в колонку.

Мы описали простейшую классическую теорию вихревой диффузии. Она основана на предположении, что молекулы как бы размещаются в определенных фиксированных струях и совершают перемещение только вместе с окружающей подвижной фазой. Другими словами, они подобно щепкам в реке перемещаются пассивно и переходят из области с одной скоростью в область с другой скоростью только вместе с потоком, за счет конвективного переноса. На самом деле молекулы могут диффундировать в поперечном направлении, попадая в области с другой скоростью течения. За счет этого число скачков увеличивается, но длина каждого скачка  $l$  уменьшается, а так как дисперсия пропорциональна  $l^2$ , то она за счет этого также существенно уменьшается.

Число скачков, совершаемых за счет конвекции, будем по-прежнему считать равным  $n_f = L / d_p$  и оценим возможное число диффузионных смещений. Чтобы вызвать переход молекулы в

область с новым значением потока, длина диффузионного смещения в поперечном направлении должна быть не меньше  $d_p$ , так как именно на этом минимальном расстоянии, как мы считаем, происходит смена скорости. Тогда, согласно закону Эйнштейна, время, необходимое на это смещение, равно

$$t_D = d_p^2 / 2D$$

За это время поток в целом пройдет расстояние

$$x_D = ut_D = ud_p^2 / 2D.$$

Число подобных смещений  $n_D$  равно, очевидно,  $L/x_D$  или

$$n_D = 2LD / (ud_p^2),$$

а суммарное число смещений

$$n = n_l + n_D = L[(1/d_p) + 2D/(ud_p^2)].$$

За это число смещений поток, двигаясь со средней скоростью  $u$ , пройдет всю длину колонки  $L$ , и следовательно, за одно смещение он проходит расстояние

$$x = L/n.$$

Время одного смещения равно

$$t_l = x/u = L/(nu).$$

За это же время данная молекула, двигаясь по каналу со скоростью, отличной от  $u$  на  $\Delta u$ , сместится относительно потока на расстояние

$$l = \Delta u t_l = L \Delta u / (nu).$$

Снова используя формулу (I.18), получим

$$\sigma^2 = (\Delta u / u)^2 L^2 / n = (\Delta u / u)^2 L / [1/d_p + 2D/(ud_p^2)],$$

откуда после замены  $0,5 (\Delta u / u)^2 = \lambda$

$$D_{\text{вихр}} = [1/\lambda d_p u + 2D/(u^2 d_p^2 \omega)]^{-1}, \quad (I.44)$$

где  $\omega$  — коэффициент, включающий величину  $\lambda$ , а также учитывающий отличие диффузионного смещения от  $d_p$ .

Рассмотренную теорию в отличие от классической называют теорией сдваивания [18, 23]. При малом значении коэффициента молекулярной диффузии или высокой скорости потока вторым членом в знаменателе уравнения (I.44) можно пренебречь, и обе теории естественно приводят к одинаковым результатам. Теория сдваивания, однако, предсказывает принципиально иные зависимости размывания от скорости, как будет показано в последующих разделах.

Рассмотренная теория вихревой диффузии основана на предположении о существовании различия в скоростях на расстояниях порядка  $d_p$ . Однако в зернистом слое могут существовать и

более крупные неоднородности — агрегаты частиц, между которыми располагаются более рыхлые участки с повышенной скоростью потока. В случае мелких частиц с  $d_p < 100$  мкм основной причиной агрегирования являются силы адгезии, т. е. межмолекулярные взаимодействия той же физической природы, которые возникают при адсорбции. Адгезионное взаимодействие частиц может возникать в жидкостной хроматографии, особенно при сухом способе упаковки насадки в колонку. В случае крупных частиц с  $d_p > 100$  мкм, используемых в газовой хроматографии, агрегаты могут иметь чисто статистическую природу и наблюдаться даже в слое гладких сфер. Все эти эффекты можно описать с помощью приведенных выше уравнений для  $D_{\text{вихр}}$  с заменой  $d_p$  на диаметр агрегата и с другими значениями коэффициента  $\lambda$ .

Гидродинамический характер имеет и возникающая в капиллярных колонках динамическая диффузия, вызванная параболическим распределением скоростей в капилляре. Распределение скоростей, близкое к параболическому, возникает иногда и в насадочных колонках, однако в этом случае наибольшая скорость наблюдается около стенки колонки; предполагается, что именно стенка оказывает возмущающее влияние на слой, препятствуя плотной укладке частиц в пристеночной области. Наличие параболического распределения скоростей приводит к тому, что молекула, двигаясь по оси капилляра, обгоняет поток, а смещаясь за счет радиальной диффузии к стенке, отстает от него. Подобные блуждания вызывают размывание полосы.

Пусть молекула двигается быстрее потока на  $\Delta u$ , тогда длина ее смещения будет равна  $\Delta u t_l$ . Время  $t_l$  равно периоду, в течение которого молекула может продиффундировать на расстояние, приблизительно равное радиусу капилляра  $r_k$ , и покинуть область высоких скоростей. Это время, согласно уравнению Эйнштейна, определяется как

$$t_l = r_k^2 / 2D,$$

откуда

$$l = \Delta u r_k^2 / 2D$$

За это же время поток пройдет расстояние

$$x = u t_l = u r_k^2 / 2D$$

Очевидно, число смещений

$$n = L/x = 2LD / u r_k^2.$$

Применив формулы (I.18) и (I.41), получим

$$D_{\text{дин}} = (\Delta u / u)^2 r_k^2 u^2 / D = \chi (r_k^2 u^2 / D), \quad (I.45)$$

где для пустого капилляра  $\chi = 1/48$ .

Если внутренние стенки капилляра покрыты сорбирующим

слоем, то  $\chi$  зависит от  $k'$ , причем в этом случае

$$\varepsilon = \pi r_k^2, \quad \kappa = 2\pi r_k d_f,$$

где  $d_f$  — толщина сорбирующего слоя (неподвижной фазы).

Полученное Голеем выражение для  $D_{\text{дин}}$  имеет вид [24]:

$$D_{\text{дин}} = [1 + 6k' + 11(k')^2] / [48(1 + k')^2] r_k^2 u^2 / D. \quad (1.46)$$

Формулу (1.45) можно применять и в случае наличия распределения скоростей в насадочной колонке, сохраняя при этом целиком выражение (1.45) и используя эмпирический коэффициент  $\chi$ , значения которого зависят от формы профиля скоростей.

Кроме рассмотренных выше, имеется еще один фактор размывания, значение которого в хроматографии в большинстве случаев оказывается определяющим. Этим фактором является конечность скорости установления сорбционного равновесия, поэтому иногда его называют кинетическим. В результате поглощения молекул сорбентом они некоторое время  $t_d$  находятся в неподвижном состоянии, в то время как центр тяжести полосы продолжает движение по колонке. Наоборот, в свободном состоянии молекулы сорбента перемещаются со скоростью элюента  $u$  быстрее, чем центр тяжести полосы, и обгоняют его. Случайный характер этого процесса вызывает расширение полосы.

Пусть за время  $t_d$  центр тяжести полосы сместится на расстояние  $uRt_d$ . Очевидно, длина скачка  $l$  выразится соотношением:

$$l = ut_d - uRt_d = ut_d(1 - R).$$

Число  $n$  скачков равно  $n = L/ut_d$ ,

откуда

$$\sigma^2 = l^2 n = ut_d(1 - R)^2 L.$$

Перейдя от  $R$  к  $k'$  согласно уравнению (1.16), получим

$$\sigma^2 = ut_d [k' / (1 + k')]^2 L.$$

Наконец, воспользовавшись для  $t_d$  выражением (1.31) и соотношением (1.41), окончательно получим

$$D_{\text{кин}} = 1/2 [k' / (1 + k')^2] (u^2 d_f^2 / D_{\text{ж}}) + \\ + 1/2 [(k')^2 / (1 + k')^2] (u^2 d_p^2 / D). \quad (1.47)$$

Численный коэффициент  $1/2$  зависит от формы пленки неподвижной фазы и уточняется при более детальном рассмотрении. Согласно неравновесной теории хроматографии для равномерной пленки он равен  $1/3$ , для волокон (бумажная хроматография) —  $1/4$ , а для сферических тел (ионная хроматография) —  $1/15$ . В дальнейшем он будет обозначен буквой  $q$ . В капиллярной хроматографии, согласно Голее, он также равен  $1/3$ .

В случае адсорбционных вариантов хроматографии пленка неподвижной фазы отсутствует. Однако внутри пористого зерна сорбента имеются мелкие плохо продуваемые или непродуваемые

поры, которые должны обмениваться веществом с потоком за счет молекулярной диффузии. Будем считать расстояние, на которое должна произойти диффузия, равным  $d_p/2$ , тогда согласно уравнению Эйнштейна (1.22) время диффузии внутрь зерна равно

$$t_l = d_p^2 / 8D.$$

Будем считать, что скорость внутри застойных пор равна нулю. Тогда за время диффузии внутрь зерна отставание от потока составит  $ut_l$ . Эту величину и принимаем за  $l$ . Число скачков

$$n = L / ut_l. \quad (1.48)$$

С учетом этих выражений для  $l$  и  $n$  получим для  $\sigma^2$  соотношение

$$\sigma^2 = u d_p^2 L / 8D,$$

перейдя от которого к коэффициенту диффузии, найдем

$$D_k = u^2 d_p^2 / 16D. \quad (1.49)$$

Наконец, в капиллярной хроматографии иногда учитывают сопротивление массопередаче на границе жидкой и газообразной фаз, соответствующее выражение для  $D_m$  имеет вид:

$$D_m = k' d_l / (1 + k')^2 k_d, \quad (1.50)$$

где  $k_d$  — константа скорости десорбции вещества с поверхности раздела газовой и жидкой фаз.

Хотя различные авторы указывали и на другие возможные источники размывания хроматографической полосы, мы ограничимся рассмотренными, как наиболее универсальными и определяющими.

## 2.4.2. Уравнение Ван-Деемтера

Рассмотренные в предыдущем разделе факторы размывания действуют независимо друг от друга и поэтому для получения суммарного эффекта их можно складывать. Полученную в результате такого сложения величину называют эффективным коэффициентом диффузии  $D_{эф}$ . Прилагательное «эффективный» подчеркивает при этом, что размывающие факторы, действующие в хроматографии, по своей физической природе отличны от обычной молекулярной диффузии, однако их действие может быть описано в рамках диффузионных законов, если в последних вместо коэффициента  $D$  использовать более значительный коэффициент  $D_{эф}$ . В частности, форма хроматографической полосы описывается уравнением (1.21), а ее дисперсия

$$\sigma^2 = 4D_{эф}t.$$

Последнее выражение означает, что квадрат ширины хромато-

графического пика пропорционален времени, причем коэффициент пропорциональности равен  $4D_{эф}$ : чем больше  $D_{эф}$ , тем быстрее происходит уширение полосы.

Однако использование времени не всегда удобно. Время перемещения полосы в свою очередь зависит от многих факторов, таких как скорость подвижной фазы, температура и др. Поэтому для характеристики интенсивности размывания в хроматографии обычно используют другую величину — высоту, эквивалентную теоретической тарелке (ВЭТТ), которую обозначим  $H$ . Определим [25]  $H$  как коэффициент пропорциональности в выражении

$$\sigma^2 = Hx, \quad (I.51)$$

согласно которому квадрат ширины хроматографической полосы пропорционален пройденному полосой расстоянию. Записанное выражение отражает основной закон размывания полосы. По мере движения по колонке полоса всегда размывается, причем дисперсия пропорциональна пройденному полосой расстоянию (рис. I 14). Однако тангенс угла наклона прямой, т. е. интенсивность размывания, может быть различной. Если колонка приготовлена хорошо и условия разделения подобраны правильно, то прямая поднимается полого, значение  $H$  мало и считается, что эффективность разделения высокая. В противном случае прямая поднимается круто, значение  $H$  велико и эффективность разделения низкая

Если задаться определенным значением  $x = L$ , т. е. рассматривать условия на выходе колонки, то в первом случае при малых  $H$  будем иметь узкие пики, а во втором случае при больших  $H$  — широкие

Установим связь между  $H$  и  $D_{эф}$ . Из уравнения (I.41), заменив

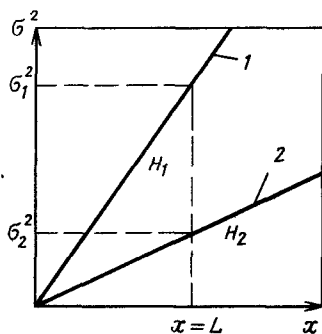


Рис I 14 Зависимость дисперсии полосы от пройденного полосой расстояния вдоль колонки ( $H_1 > H_2$ )

1 — неэффективная колонка 2 — эффективная колонка

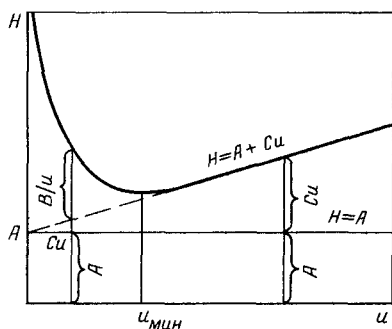


Рис I 15 График зависимости  $H$  от  $u$

$L$  на текущую длину  $x$ , получим с учетом уравнения (I.51):

$$H = 2D_{эф}/u \quad (I.52)$$

Считая, что в насадочной колонне основными размывающими факторами являются молекулярная, вихревая диффузия (в классической форме) и кинетический фактор (внутренняя диффузия), сложив уравнения (I.42), (I.43) и (I.47) и используя затем уравнение (I.52), получим уравнение, называемое уравнением Ван-Деемтера:

$$H = 2\lambda d_p + (2D\gamma/u) + [k'/(1+k')^2](ud_f^2/D_{ж}) \quad (I.53)$$

Это уравнение связывает ВЭТТ с условиями разделения. В частности, зависимость  $H$  от скорости потока подвижной фазы можно выразить в простой форме, обозначив все независимые от скорости величины через  $A$ ,  $B$ , и  $C$ :

$$H = A + B/u + Cu \quad (I.54)$$

В этой форме, иногда дополненной другими членами, уравнение Ван-Деемтера используют для эмпирической обработки экспериментальных данных по определению ВЭТТ. График зависимости  $H$  от  $u$  приведен на рис. I.15.

При больших скоростях газа-носителя второй член становится пренебрежимо малым, а само уравнение переходит в уравнение прямой

$$H = A + Cu \quad (I.55)$$

Отрезок, отсекаемый этой прямой на оси ординат, дает значение независимого от скорости члена  $A$ , обусловленного «вихревой диффузией». Член  $Cu$  определяется длиной отрезка, заключенного между прямой, описываемой уравнением (I.55), и прямой  $H = A$ , параллельной оси абсцисс. Естественно, что с ростом скорости член  $Cu$  увеличивается. Соответственно, член  $B/u$  определяется длиной отрезка, заключенного между всей кривой  $H = f(u)$  и прямой  $H = A + Cu$ . Этот член возрастает с уменьшением скорости  $u$ .

Кривая  $H = f(u)$  представляет собой параболу и имеет минимум, положение которого определяется равенством

$$u_{мин} = \sqrt{B/C} \quad (I.56)$$

Справа от этого минимума размывание полосы определяется преимущественно кинетическими факторами, соответственно правую ветвь кривой называют кинетической. Слева от минимума размывание определяется молекулярной диффузией и левую ветвь поэтому называют диффузионной. Таким образом, анализ полученной экспериментально кривой Ван-Деемтера позволяет оценить относительный вклад отдельных составляющих в размывание полосы, а также определить их абсолютную величину. В настоящее время такую оценку проводят обычно не графическим методом, а с использованием ЭВМ.



В некоторых случаях, например в жидкостной хроматографии, минимум кривой  $H=f(u)$  не достигается. Это связано с малыми значениями коэффициентов диффузии в жидкостях (мал член  $B$ ), вследствие чего положение минимума смещается в область очень малых скоростей, на практике обычно не используемых и даже трудно получаемых экспериментально. Однако минимум кривой должен обязательно существовать: при  $u \rightarrow 0$   $H \rightarrow \infty$ , что вытекает из закона (1.51). Действительно, если прервать поток, то полоса остановится, хотя будет размываться за счет молекулярной диффузии, пусть даже и очень медленно. Таким образом, если принять момент остановки за начало отсчета времени, а положение центра тяжести полосы в этот момент за начало координат, то через какое-то время обнаружим:  $x=0$ ;  $\sigma^2$  — конечная, пусть и малая величина и  $H=\sigma^2/x=\infty$ .

### 2.4.3. Влияние условий разделения на эффективность

Уравнение Ван-Деемтера позволяет проанализировать влияние различных параметров на размывание полосы. Такой анализ стимулирует поиск условий, обеспечивающих наиболее оптимальное проведение хроматографического процесса. Мы уже видели, например, что имеется скорость  $u_{\min}$ , при которой ВЭТТ минимальна. Правда, эта скорость обычно мала, поэтому для ускорения анализа предпочитают работать при некоторой оптимальной скорости  $u_{\text{опт}} > u_{\min}$ , т. е. в кинетической области. Это тем более оправдано, что кинетическая ветвь обычно поднимается полого, так что довольно существенное увеличение скорости вызывает незначительное возрастание ВЭТТ, в то время как продолжительность анализа уменьшается при этом существенно ( $t_R \sim u^{-1}$ ).

Важным параметром, сильно влияющим на размывание, является диаметр зерна сорбента; с его уменьшением уменьшаются члены уравнения Ван-Деемтера, обусловленные вихревой диффузией и внешней массопередачей. Влияние зернения сорбента на внешнюю массопередачу понять нетрудно: с уменьшением зерен уменьшаются и зазоры между ними, т. е. сокращается путь диффузии сорбата из потока, текущего в этих зазорах, к поверхности зерен. Что касается вихревой диффузии, то с уменьшением диаметра зерна уменьшается длина случайного скачка и увеличивается во столько же раз число скачков, что в совокупности должно уменьшать  $\sigma^2$ . Если бы удалось раздробить зерна до размера, равного длине свободного пробега молекул, то зерна перестали бы существовать и вихревая диффузия исчезла бы.

В адсорбционной хроматографии вместо третьего члена уравнения Ван-Деемтера (1.53) следует подставить величину  $2D_k/u$  [см. уравнение (1.49)], в результате получим третий член в виде  $ud_p^2/8D$ . Он также резко уменьшается с уменьшением  $d_p$  из-за

сокращения пути диффузии внутрь зерна по системе пор, заполненных подвижной фазой.

Довольно заметное снижение  $H$  с уменьшением  $d_p$  вынуждает использовать сорбенты мелкого зернения, хотя это и приводит к увеличению гидравлического сопротивления колонки. Обычно в газовой хроматографии используют сорбенты с диаметром зерна от  $0,2 \div 0,3$  до  $0,1$  мм. Более мелкие сорбенты применяют редко, промышленность их не выпускает не только из-за высокого гидравлического сопротивления, но и вследствие трудности их рассева на ситах.

В практике жидкостной хроматографии сорбенты с диаметром зерна  $30\text{--}60$  мкм упаковывают в колонку достаточно эффективно сухим способом. При уменьшении диаметра зерна ниже этого предела эффективность резко ухудшается из-за агрегирования частиц вследствие их адгезии и при упаковке сорбента в колонку используют суспензионные методы. С их помощью удастся упаковать частицы диаметром  $5\text{--}10$  мкм и даже  $2\text{--}3$  мкм. Их применение позволяет добиться исключительно высокой эффективности: если в газовой хроматографии ВЭТТ обычных насадочных колонок редко бывает ниже  $300\text{--}500$  мкм, то в жидкостной хроматографии она вполне может достигать  $10$  мкм.

Кроме среднего диаметра зерна сорбента  $d_p$  большое значение имеет узость гранулометрического состава. Любые хроматографические сорбенты после их получения и измельчения рассеивают на ситах, сорбенты мелкого зернения, используемые для жидкостной хроматографии, разделяют на фракции седиментацией или на специальных рассеивающих машинах. При выводе уравнения Ван-Деемтера предполагалось, что все зерна сорбента имеют одинаковый диаметр  $d_p$ . Такие моодисперсные сорбенты получить практически невозможно, поэтому под  $d_p$  понимают обычно средний диаметр зерна. Распределение зерен по диаметрам простейшей теорией, каковой является теория Ван-Деемтера, не учитывается. Большинство экспериментов показывает, однако, что чем уже гранулометрический состав сорбента, тем выше эффективность. Чрезмерному сужению используемой фракции сорбента препятствуют два обстоятельства. Во-первых, сетки, из которых изготавливают сита, выпускаются промышленностью только дискретных размеров. Во-вторых, операция рассева довольно дорогая и при чрезмерном сужении гран-состава стоимость сорбентов возрастает. В настоящее время выработался определенный компромисс между достижением высокой эффективности и практическими возможностями рассева сорбентов. Для газовой хроматографии диатомитовые носители и сорбенты обычно выпускают следующих зернений:  $0,11\text{--}0,16$  мм;  $0,16\text{--}0,2$  мм;  $0,2\text{--}0,25$  мм;  $0,25\text{--}0,315$  мм.

Сорбенты, выпускаемые для жидкостной хроматографии, обычно характеризуют только средним диаметром частиц, указывая иногда процентное содержание основной, более мелкой и более

крупной фракции, а также пыли. Последняя присутствует во многих носителях, считается, что ее наличие ухудшает эффективность, поэтому при проведении тонких разделений диатомитовые носители и силикагели для жидкостной хроматографии рекомендуют иногда отмучивать от пыли в воде.

Важным параметром, довольно сильно влияющим на эффективность, является толщина пленки неподвижной фазы  $d_f$ . Конечно, в реальных условиях неподвижная фаза не всегда распределяется на поверхности носителя в виде пленки, в некоторых случаях при плохом смачивании она, вероятно, может образовывать капли. Однако в любом случае развитие поверхности носителя и снижение степени пропитки его неподвижной фазой способствует увеличению эффективности. По этой причине розовые носители, имеющие более развитую поверхность, как правило, обеспечивают и более высокую эффективность, чем белые носители. К сожалению, имеется определенный предел как развитию поверхности носителя, так и снижению степени пропитки, связанный с адсорбционной активностью носителя.

До сих пор, описывая физико-химические процессы, происходящие в хроматографической колонке, мы принимали, что твердый носитель не участвует в разделении, а только увеличивает поверхность контакта между газовой и жидкой фазами. В реальных условиях это, конечно, не так: любое твердое тело, обладающее развитой поверхностью, способно адсорбировать пары веществ и, следовательно, участвовать в разделении. Чаще всего роль носителя оказывается при этом негативной: его адсорбционные центры, вероятно, сильно различаются по активности, что вызывает асимметрию хроматографических пиков, размывание их задних фронтов. Особенно это заметно проявляется при разделении полярных соединений, таких как спирты и карбоновые кислоты.

То же самое ограничение накладывается и на степень пропитки: при ее уменьшении возрастает влияние адсорбции на твердом носителе и симметрия пиков, как правило, ухудшается. Адсорбция на твердом носителе наблюдается, конечно, и при сплошном покрытии его поверхности неподвижной фазой. В этом случае разделяемые вещества вначале растворяются в неподвижной фазе, а затем из образовавшегося раствора адсорбируются поверхностью носителя. Поскольку, однако, раствор вещества в неподвижной фазе является очень разбавленным, конкуренция неподвижной фазы за адсорбционные центры носителя препятствует адсорбции разделяемого вещества. В этих условиях только хорошо сорбирующиеся на кремнеземах полярные вещества, разделяемые на неполярных фазах, могут образовывать асимметричные пики; при использовании полярных фаз, также хорошо адсорбируемых кремнеземами, этого обычно не наблюдается. При чрезмерном уменьшении степени пропитки раствор разделяемых веществ в неподвижной фазе получается более концентриро-

ванным, и конкуренция неподвижной фазы при адсорбции ослабевает. Кроме того, возможно нарушение сплошного покрытия носителя, образование участков, свободных от неподвижной фазы, на которых вещество адсорбируется непосредственно из газовой фазы. В этом случае асимметрия пиков становится особенно заметной.

Необходимо учитывать также, что уменьшение степени пропитки снижает не только  $d_i$ , но и коэффициент  $\kappa$ , а значит и  $k'$ . Последний также влияет на третий член уравнения Ван-Деемтера: множитель  $k'/(1+k')^2$  имеет максимальное значение при  $k'=1$ , уменьшаясь как при снижении, так и при увеличении  $k'$ . Поэтому уменьшая  $\kappa$ , следует избегать значений  $k'=1$ . Наконец, необходимо учитывать, что снижение  $k'$  ниже определенного предела приводит к уменьшению коэффициента селективности колонки (см. ниже). По этим причинам содержание неподвижной фазы обычно не делают ниже 3—5% от массы твердого носителя.

Как видно из уравнения (1.53), существенное влияние на размывание должен оказывать и коэффициент диффузии в пленку неподвижной фазы. Согласно уравнению (1.14), эта величина зависит в первую очередь от вязкости неподвижной фазы. Желательно поэтому применение маловязких неподвижных фаз. Однако при выборе последних основное внимание уделяют селективности и термостойкости, коэффициент диффузии учитывают в последнюю очередь.

Чтобы покончить с влиянием сорбента на эффективность разделения, отметим, что она в сильной степени зависит от природы твердого носителя. Трудно однозначно ответить, какое качество твердого носителя является при этом определяющим: структура и диаметр пор, смачиваемость поверхности или что-то другое. Эксперименты, однако, показывают, что сорбенты, полученные на основе сходных носителей с близкой удельной поверхностью различаются по эффективности иногда в 1,5—2 раза. Это обстоятельство необходимо учитывать при выборе носителя.

Кроме коэффициента диффузии определенное влияние на эффективность оказывает и сорбция вещества неподвижной фазой, характеризующая коэффициентом  $k'$ . Этот коэффициент входит в третий член уравнения (1.53), который при достаточно больших значениях ( $k' > 1$ ) обратно пропорционален  $k'$ . Последнее означает, что полосы хорошо сорбируемых веществ при прочих равных условиях размываются слабее, чем полосы плохо сорбируемых веществ, поскольку они двигаются по колонке медленнее, и за время нахождения молекулы в неподвижном состоянии центр тяжести полосы успевает сместиться на небольшое расстояние, т. е. случайный скачок  $l$  оказывается небольшим. Другими словами, медленнодвигающиеся полосы хорошо сорбирующихся компонентов ближе к равновесным условиям, чем полосы плохо сорбируемых компонентов.

Из других параметров некоторое влияние на ВЭТТ в условиях газовой хроматографии оказывает температура, с ростом которой увеличиваются коэффициенты диффузии  $D$  и  $D_*$  и уменьшается коэффициент  $k'$ . Поскольку эти изменения  $D$  и  $k'$  увеличивают, а изменение  $D_*$  уменьшает ВЭТТ, следует ожидать экстремальной зависимости  $H$  от  $T$ , что и наблюдается обычно на практике: с ростом  $T$  величина  $H$  проходит через минимум. Однако температурная зависимость  $H$  не очень значительна, поэтому при подборе оптимальной температуры принимают во внимание больше ее влияние на селективность и продолжительность анализа, а не на величину ВЭТТ.

Увеличение давления уменьшает размывание, так как при этом уменьшается коэффициент газовой диффузии  $D$  [см. уравнение (1.23)]. Однако этот параметр редко используют для улучшения разделения, поскольку рост входного давления вызывает сложности технического порядка; большинство выпускаемых аналитических хроматографов не рассчитано на входные давления более 0,3—0,5 МПа.

#### 2.4.4. Уравнение Голея

Для капиллярных колонок уравнение, аналогичное уравнению Ван-Деемтера, получают, используя соотношение (1.52) между  $H$  и  $D_{эф}$  и выражения (1.42) без  $\gamma$ , (1.46) и (1.47):

$$H = (2D/u) + [(1 + 6k' + 11(k')^2)/[24(1 + k')^2][r_k^2 u/D] + 2/3 [k'/(1 + k')^2] d_p^2 u/D_*$$
(1.57)

Это уравнение впервые получено Голеем [24]. Иногда его дополняют членом (1.50), хотя при использовании последнего возникают некоторые трудности с определением численных значений коэффициента  $k_d$ .

В капиллярных колонках подобно насадочным зависимость  $H$  от  $u$  проходит через минимум, однако в этом случае член  $A$  отсутствует и продолжение правой прямолинейной ветви кривой в область малых скоростей должно приводить в начало координат, что подтверждается экспериментально. Отмечается, что уравнение Голея дает удовлетворительное полуколичественное совпадение с экспериментом. Вообще, процессы в капиллярных колонках с гладкими стенками значительно проще, чем в насадочных, вывод уравнения Голея более строг, оно не содержит эмпирических коэффициентов вроде  $\gamma$  и  $\lambda$  и в отличие от уравнения Ван-Деемтера и его многочисленных модификаций может применяться при расчетах. Оно позволяет также сделать некоторые выводы о влиянии условий разделения на ВЭТТ [24].

Чтобы проанализировать это влияние, необходимо учесть, что в капиллярной хроматографии

$$\varepsilon = \pi r_k^2, \quad \kappa = 2\pi r_k d_f,$$

откуда

$$k' = K\kappa/\varepsilon = 2d_f K/r_k.$$

Поэтому уменьшение радиуса капилляра приводит не только к явному уменьшению второго члена уравнения Голея, но и влияет как на этот, так и на третий член через увеличение  $k'$ . Функция от  $k'$ , входящая во второй член, увеличивается с ростом  $k'$ : она равна  $1/24$  при  $k'=0$  и  $11/24$  при  $k' \rightarrow \infty$ . Однако зависимость этой функции от  $r_k$  все же более слабая, чем от  $r_k^2$ , поэтому весь второй член с уменьшением  $r_k$  также уменьшается. Что касается третьего члена, то, как уже указывалось, величина  $k'/(1+k')^2$  максимальна при  $k'=1$ . Если учесть, что капиллярную хроматографию, как правило, применяют для разделения веществ с  $k' > 1$ , то увеличение  $k'$ , вызванное уменьшением  $r_k$ , должно в таком случае сопровождаться уменьшением третьего члена уравнения Голея. Все это приводит к выводу о снижении  $H$  с уменьшением  $r_k$ .

Уменьшение толщины пленки неподвижной фазы снижает  $k'$  и соответственно второй член уравнения Голея. Хотя при этом множитель  $k'/(1+k')^2$  возрастает, но более медленно, чем  $d_f^2$ , поэтому третий член этого уравнения также уменьшается. В частности, при очень больших  $k'$  этот член пропорционален  $d_f^2/k'$  или  $d_f$ . Однако чрезмерное уменьшение толщины пленки будет приводить к снижению селективности колонки и поэтому нежелательно. Реально  $d_f$  в капиллярных колонках составляет обычно  $0,1—1,5$  мкм.

Разные газы-носители характеризуются различными значениями коэффициента диффузии: чем ниже молекулярная масса газа-носителя, тем выше  $D$ . При переходе к газам-носителям с большими коэффициентами диффузии первый член уравнения (I.57) увеличивается, а второй уменьшается, что в соответствии с уравнением (I.56) должно смещать минимум кривой  $H=f(u)$  в область больших скоростей; сам минимум при этом тоже увеличивается, поскольку в этой области скоростей влияние первого члена уравнения (I.57) велико. При больших скоростях газа значение первого члена ослабевает, а второго увеличивается, и более предпочтительным оказывается использование газов с большими коэффициентами диффузии. Наклон кинетической ветви кривой  $H=f(u)$  при этом также уменьшается.

#### 2.4.5. Уравнение Гиддингса

Как уже указывалось, Гиддингсом была разработана теория сдвигания [18], которая приводит к специфической форме уравнения для вихревой диффузии (I.44). Суммируя это уравнение с соотношениями (I.42), (I.47) и (I.49), а также учитывая, как и ранее, уравнение (I.52), получим выражение для ВЭТТ, соответ-

ствующее теории сдваивания:

$$H = (2D\gamma/u) + [k'/(1+k')^2] \{ud_p^2/D_{ж}\} + (d_p^2 u / (16D) + 1/[1/(2\lambda d_p) + D/(\omega u d_p^2)]), \quad (1.58)$$

или, обозначая буквами  $A$ ,  $B$ ,  $C$ ,  $C_m$  члены, не зависящие от  $u$ , запишем:

$$H = B/u + Cu + [1/A + 1/(C_m u)]^{-1}$$

Чаще всего уравнение Гиддингса записывают в безразмерных переменных. Во-первых, величину  $H$  относят к диаметру зерна сорбента, получая приведенное значение  $h = H/d_p$ . Смысл такого приведения заключается в том, что минимально возможное значение  $H$  равно  $d_p$ , поэтому величина  $h$  показывает, во сколько раз реальная ВЭТТ отличается от этого предельного значения. Скорость также представляют в виде безразмерной величины  $v = ud_p/D$ . Физический смысл последней заключается в том, что она является мерой отношения интенсивностей диффузионного и потокового механизмов переноса. Действительно, среднее время диффузии молекулы на расстояние  $d_p$  равно  $d_p^2/2D$ , а время ее смещения с потоком (конвекцией) на то же расстояние равно  $d_p/u$ . Отношение этих времен, если опустить 2, равно  $ud_p/D$ . При  $v < 1$  преобладает диффузионное (время диффузии меньше), а при  $v > 1$  конвективное смещение. В безразмерных переменных уравнение Гиддингса записывают в виде

$$h = (2b/v) + \zeta v + \{1/[1/(2\lambda) + 1/(\omega v)]\},$$

где  $b$  — константа;  $\zeta = CD/d_p^2$ .

Удобство применения приведенных переменных  $h$  и  $v$  заключается в том, что с их помощью можно сопоставлять различные системы, например газовую и жидкостную хроматографии. Более широко их применяют в последней. Основное отличие уравнения Ван-Деемтера от уравнения Гиддингса заключается в разной трактовке вихревой диффузии. Согласно первому из этих уравнений, член, описывающий вихревую диффузию, является постоянным и не зависит от скорости (рис. 1.16). Согласно теории сдваивания, при малых скоростях этот член пропорционален скорости; преобладает диффузионный перенос молекул из одного

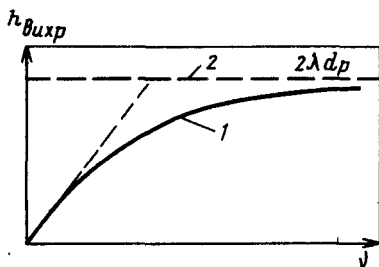


Рис. 1.16. Зависимость вихревой диффузии от приведенной скорости согласно уравнениям Гиддингса (1) и Ван-Деемтера (2)

канала в другой. С увеличением скорости пропорциональность нарушается из-за возникновения конвективного механизма переноса, при высоких скоростях этот механизм становится преобладающим и значение  $H$ , обусловленное вихревой диффузией, стабилизируется на постоянном значении, предсказываемом классической теорией. Смена механизмов переноса происходит при  $v=1$ . Если взять типичные для газовой хроматографии значения  $D=0,25 \text{ см}^2/\text{с}$  и  $d_p=0,025 \text{ см}$ , то  $v=1$  соответствует  $u=10 \text{ см/с}$ ; такие скорости обычно и используют в газовой хроматографии. Для жидкостной хроматографии при  $D=10^{-5} \text{ см}^2/\text{с}$  и  $d_p=10^{-3} \text{ см}$  аналогичное значение  $u=10^{-2} \text{ см/с}$  значительно меньше применяемых на практике. Поэтому в жидкостной хроматографии можно, по-видимому, считать преобладающим конвективный механизм и использовать для описания размывания уравнение Ван-Деемтера, в котором, к тому же, можно пренебречь диффузионным членом.

#### 2.4.6. Расчет ВЭТТ из хроматограммы

Уравнения Ван-Деемтера, Голя и Гиддингса позволяют проанализировать влияние различных параметров на ВЭТТ, обработать экспериментальные данные. Однако возникает вопрос о способе расчета ВЭТТ из хроматограммы, которая является единственным результатом хроматографического разделения, получаемым аналитиком.

Обратимся к уравнению (1.51), подставив в него вместо  $x$  значение  $L$  (т. е. рассматривая ситуацию в конце колонки), а вместо  $\sigma$  величину  $\Delta x/4$ , где  $\Delta x$  — ширина пика, измеренная касательными в точках перегиба, которая, как уже указывалось, равна  $4\sigma$ . В результате получим

$$H=1/16\Delta x^2/L \quad (1.59)$$

Входящая в это выражение величина  $\Delta x$  представляет собой ширину пика, измеренную непосредственно на слое сорбента. В колоночной хроматографии при разделении неокрашенных веществ эта величина недоступна непосредственному измерению и от нее необходимо перейти к ширине пика во времени, которая фиксируется по хроматограмме.

Рассмотрим ситуацию на конце колонки, когда передний фронт полосы подошел к ее срезу (рис. 1.17). Задний фронт будет двигаться со скоростью  $v$  и выйдет из колонки через отрезок времени  $\Delta t=\Delta x/v$  после выхода переднего. Величина  $\Delta t$  и будет равна ширине пика, зафиксированной на хроматограмме. Умножив и разделив отношение (1.59) на  $L$  и  $v^2$  получим

$$H=L/16(\Delta x/v)^2/(L/v)^2$$



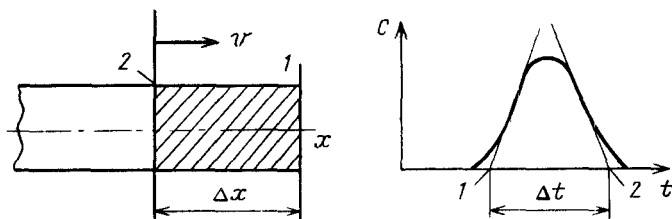


Рис 1.17 Переход от ширины полосы на слое сорбента  $\Delta x$  к ширине полосы во времени  $\Delta t$  (1, 2 — передний и задний фронты)

Учитывая, что  $L/v = t_m$ , окончательно придем к выражению

$$H = L/16(\Delta t/t_m)^2 \quad (1.60)$$

Можно за основу взять ширину пика, измеренную не по касательным, а ширину, измеренную на любой относительной высоте пика. Уже указывалось, что полуширина кривой Гаусса на высоте, равной 0,607 от максимальной, равна  $\sigma$ , откуда  $\Delta x_{0.607} = 2\sigma$ . Поэтому, если использовать при расчете величину  $\Delta t_{0.607}$ , надо просто численный коэффициент в формуле (1.60) сменить на 1/4. Чаще всего ширину пика измеряют на половине высоты, тогда

$$C/C_{\max} = 1/2 = e^{-x^2/2\sigma^2}$$

откуда

$$x^2/2\sigma^2 = \ln 2 \text{ и } x = \sqrt{2 \ln 2} \sigma = 1,177\sigma$$

Соответственно

$$\Delta x_{0.5} = 2x = 2,35\sigma,$$

и в формулу (1.60) при использовании  $\Delta t_{0.5}$  надо подставить коэффициент 1/5,54 ( $5,54 = 2,3548^2$ ).

Величина ВЭТТ имеет размерность длины и ее можно трактовать как длину слоя сорбента, на которой устанавливается сорбционное равновесие. Безразмерное отношение

$$N = L/H, \quad (1.61)$$

называемое числом теоретических тарелок, показывает, сколько раз по длине колонки установится сорбционное равновесие. Чтобы более наглядно представить себе это понятие, рассмотрим теорию тарелок.

## 2.4.7. Теория тарелок

Представим себе аппарат (он реально используется в экстракции и называется аппаратом Крейга), состоящий из ряда сосудов, частично заполненных одинаковым количеством сорбента. Части сосудов, называемых тарелками, заполненные подвижной фазой,

связаны между собой. Предположим, что при установлении сорбционного равновесия вещество распределяется поровну между сорбентом и подвижной фазой ( $k' = 1$ ). Внесем в первый сосуд 640 частей сорбата и дождемся установления в этом сосуде сорбционного равновесия, после достижения которого в подвижной фазе и на сорбенте будет находиться по 320 частей вещества. Перенесем весь объем подвижной фазы из первого сосуда во второй, а на его место введем чистую подвижную фазу. В первом сосуде произойдет десорбция вещества с сорбента, и оставшиеся в этом сосуде 320 частей вещества опять перераспределятся по 160 частей. Во втором сосуде произойдет сорбция 320 частей вещества, после завершения которой установится такое же распределение, как и в первом сосуде.

Снова перенесем весь объем подвижной фазы из второго сосуда в третий, из первого во второй, а в первый введем чистую подвижную фазу. Если повторять этот процесс достаточно долго, то будем получать распределения по сосудам, показанные на рис. 1.18. Если говорить о физической картине явления, то наблюдаемый процесс отличается от хроматографического. Здесь отсутствуют диффузионные явления (диффузии между сосудами не происходит), в каждом сосуде устанавливается сорбционное равновесие, время процесса не играет никакой роли. Однако, рассматривая картину распределения вещества по сосудам на каждом этапе, мы видим и много общего с хроматографией: распределение вещества представляет собой симметричную кривую с максимумом; максимум и вся кривая постепенно смещаются к выходу системы; вещество размывается по все большему числу сосудов, т. е. происходит размывание полосы. Если предположить, что введено два вещества с разным значением  $K$ , то увидим их постепенное отделение друг от друга. Была рассмотрена простейшая тарельчатая модель, при которой подвижная фаза перемещается между сосудами конечными порциями, равными объему подвижной фазы в каждом сосуде  $V_{гг}$ . Но картина практически не изменится, если пропускать подвижную фазу непрерывно, предполагая все время идеальное ее перемешивание в объеме каждого сосуда и мгновенное установление равновесия между фазами.

Количественный анализ показывает, что несмотря на различие в физической картине, конечный результат, получающийся на выходе аппарата Крейга при большом числе тарелок, не отличается от наблюдаемого на выходе хроматографической колонки. Если представить себе «черный ящик», внутри которого находится разделительное устройство, то по выходному сигналу — хроматограмме — невозможно понять, находится ли внутри ящика тарельчатый аппарат Крейга или хроматографическая колонка. Поскольку процесс в тарельчатом аппарате прост, легко поддается изучению, то его удобно использовать в качестве модели хро-

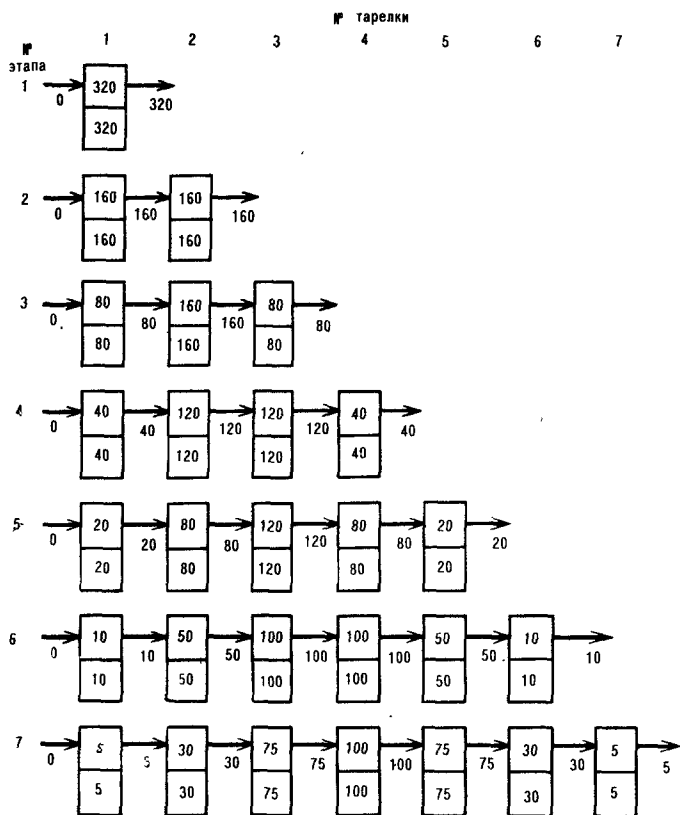


Рис. I.18. Распределение вещества по тарелкам на разных этапах

матографической системы. Так как реальных тарелок в последней нет, применяют термин «теоретическая тарелка». Когда говорят, что хроматографическая колонка содержит 1000 теоретических тарелок, это означает, что по своему действию она эквивалентна тарельчатому аппарату с 1000 тарелок.

На основе тарельчатой модели невозможно исследовать влияние реальных условий анализа (скорости газа-носителя, зерна сорбента и других) на размывание полосы и разделение, однако она дает наглядную интерпретацию таким понятиям, как число теоретических тарелок и ВЭТТ, позволяет легко связать их с достигаемым разделением и в этом отношении дополняет рассмотренную выше физическую картину процесса.

Если в реальной хроматографии концентрация вещества является функцией пространственной координаты и времени  $C = f(x, t)$ , то в тарельчатой модели роль пространственной координаты

играет число теоретических тарелок  $N$ , пройденное веществом, а роль времени — объем подвижной фазы  $V$ , пропущенный через систему тарелок. Обычно этот объем также выражают в безразмерном виде

$$\bar{V} = V/V_s.$$

Эффективный объем теоретической тарелки  $V_s$  определяют соотношением

$$V_s = V_{\text{гт}} + KV_{\text{жт}},$$

где  $V_{\text{гт}}$  и  $V_{\text{жт}}$  — объемы подвижной фазы и сорбента, находящиеся на одной теоретической тарелке.

Если пропустить вещество через систему  $N$  тарелок, то на выходе из системы получится пик, описываемый уравнением Гаусса, причем удерживаемый объем этого пика  $V_m$  (не приведенный) и его ширина, измеренная методом касательных, будут описываться простыми соотношениями

$$V_m = NV_s; \Delta V = 4\sqrt{N} V_s,$$

откуда можно сразу же получить формулу для расчета  $N$  (поделив первое равенство на второе и возведя в квадрат):

$$N = 16 (V_m / \Delta V)^2 \quad (1.62)$$

Аналогичное соотношение получится, если использовать ширину пика на половине высоты, только численный коэффициент будет равен не 16, а 5,54.

Если с помощью формулы (1.61) перейти от  $N$  к  $H$ , то придем к соотношениям, полученным ранее. То обстоятельство, что в одних из них фигурируют временные ( $t_m$  и  $\Delta t$ ), а в других объемные ( $V_m$  и  $\Delta V$ ) величины, не должно смущать, поскольку они пропорциональны друг другу (коэффициент пропорциональности — расход подвижной фазы), а в формулах фигурируют их отношения; при этом, естественно,  $t_m / \Delta t = V_m / \Delta V$ . На практике из хроматограммы сначала рассчитывают  $N$ , а затем  $H$ , причем в формулу подставляют длины отрезков, измеряемые по хроматограмме:  $l = u_d t_m$  и  $\Delta s = u_d \Delta t$ , где  $u_d$  — скорость диаграммной ленты,  $l$  — расстояние по диаграммной ленте от момента ввода пробы до максимума пика,  $\Delta s$  — ширина пика на хроматограмме. Естественно, что  $t_m / \Delta t = l / \Delta s$ , и формула (1.62) приобретает вид

$$N = 16 (l / \Delta s)^2.$$

#### 2.4.8. Влияние объема пробы на эффективность

До сих пор, рассматривая эффективность хроматографических колонок, считали, что проба вводится в ничтожно малом объеме подвижной фазы, сорбируется очень узким начальным слоем сорбента, образуя первоначальную полосу, которая затем под влиянием потока подвижной фазы начинает перемещаться по колонке,

размываясь под влиянием факторов, рассмотренных в разд. 2.4.1. Эти факторы в дальнейшем будем называть диффузионно-кинетическими. На самом деле аналитик вынужден иногда дозировать в колонну большие объемы разделяемой смеси. Такая необходимость возникает, например, при анализе микроконцентраций. Часто колонка обладает очень малой сорбционной емкостью, поэтому даже обычно применяемые пробы оказываются для нее чрезмерными. С такими ситуациями нередко сталкиваются в капиллярной хроматографии, особенно при малом диаметре капилляра и тонкой пленке неподвижной фазы. Поэтому необходимо рассмотреть влияние объема пробы на эффективность и высоту пика.

Рассмотрим простейший пример: необходимо определить в воздухе какое-либо токсичное вещество. Его концентрация в воздухе мала, поэтому отобрав газовым шприцем довольно значительный объем воздуха, равный  $5\text{--}10\text{ см}^3$ , вводим этот объем в колонку. Считаем, что сам воздух не сорбируется, т. е. ничем не отличается от газа-носителя, размывания полосы за счет диффузионно-кинетических факторов на начальном участке не происходит. По окончании дозирования сорбированная примесь распределится на некотором начальном участке колонки длиной  $\Delta x_n$ , которую определим, составив для этого участка уравнение материального баланса. В элемент длиной  $\Delta x_n$  вошел объем газа  $V_n$  с концентрацией вещества  $C_n$ , а покинул тот же объем, но с нулевой концентрацией. Количество вещества  $V_n C_n$  израсходовано на насыщение сорбента, объем которого равен  $\Delta x_n S_{\text{кол}}$ , до концентрации  $a_n$ , причем концентрации  $a_n$  и  $C_n$  находятся в равновесии (процесс протекает медленно и равновесие успевает установиться), т. е.  $a_n = \Gamma C_n$ . Итак,

$$V_n C_n = \Delta x_n S_{\text{кол}} a_n = \Delta x_n S_{\text{кол}} \Gamma C_n, \quad (1.63)$$

откуда

$$\Delta x_n = V_n / S_{\text{кол}} \Gamma. \quad (1.64)$$

Первоначальная ширина полосы определяется только объемом введенной пробы, сечением колонки и коэффициентом Генри и не зависит (в условиях линейной изотермы) от концентрации вещества  $C_n$ . Последнее обстоятельство следует подчеркнуть особо, поскольку бытует мнение, что чем меньше  $C_n$ , тем больший объем пробы можно пропустить через данный объем сорбента до проскока примеси. Такое мнение основано на предположении, что сорбент имеет большое число центров адсорбции и пока не будут заполнены все эти центры, адсорбция будет продолжаться, причем чем меньше вещества в объеме газа, тем медленнее будет идти это насыщение. В этих рассуждениях не учитывают динамический характер физической адсорбции. Предположим, что имеется элементарный слой толщиной в одно зерно, а  $k' = 1$ , т. е. количества вещества в газовой фазе и на сорбенте равны друг

другу или, что то же самое, вероятность сорбции равна вероятности десорбции. Пусть с элементарным объемом  $\Delta V_1$  поступило  $n$  молекул, которые сорбировались на слое. Если теперь со следующим объемом  $\Delta V_2$  поступит еще  $n$  молекул, то они не смогут адсорбироваться (независимо от общего числа сорбционных центров), поскольку на сорбенте находится  $n$  молекул, в газовой фазе (в объеме  $\Delta V_2$ ) тоже  $n$  и условие  $k'=1$  уже выполнено. Вернее, адсорбция каждой  $(n+1)$ -й молекулы будет вызывать десорбцию одной молекулы (вероятности адсорбции и десорбции равны), а макроскопическая картина будет неизменна. Молекулам из второй порции газа придется адсорбироваться на следующем, свободном слое адсорбента. Наши рассуждения никак не изменятся, если в элементарном объеме будет не  $n$ , а  $n/2$  или  $2n$  молекул, важно только, чтобы  $k'$  сохранялось неизменным, а это условие выполняется при линейной изотерме.

Разумеется, условие формирования первоначальной полосы шириной  $\Delta x_n$  не изменится, если вместо газового шприца дозировать жидкую смесь микрошприцем. Проба испаряется в испарителе хроматографа, при этом ее объем увеличивается приблизительно в 1000 раз, частично разбавляется газом-носителем и его потоком вносится в колонку. В жидкостной хроматографии проба заранее разбавляется подвижной фазой и подается в колонку из петли (аналогично вводу шприцем) либо микрошприцем на слой сорбента.

Эту широкую первоначальную полосу мысленно можно разбить на ряд узких; при движении по колонке крайние полосы будут размываться с той же интенсивностью, что и ранее, когда мы перемещали по колонке одну узкую полосу. Процесс размывания

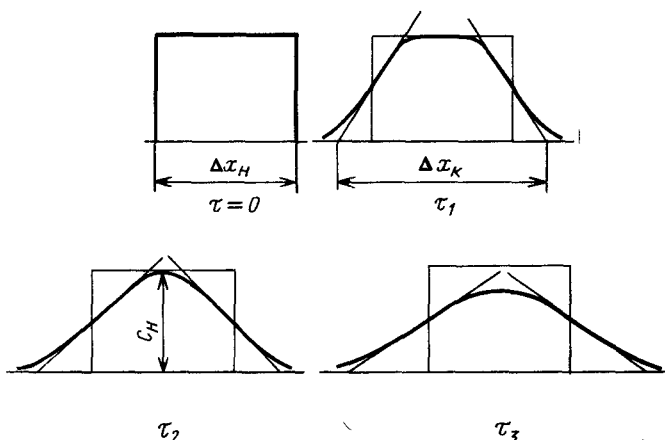
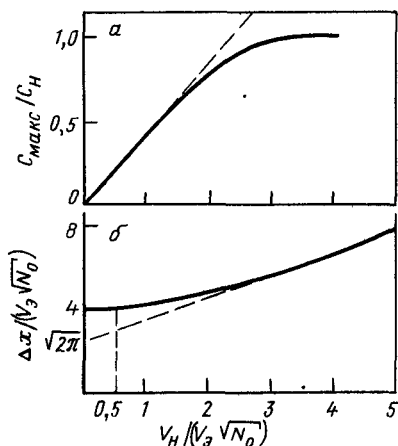


Рис. 1.19. Размывание широкой первоначальной полосы при ее движении по колонке

Рис. I.20. Зависимость концентрации в максимуме пика (а) и ширины пика (б) от объема вводимой пробы



будет постепенно распространяться вглубь широкой полосы. Если колонка достаточно коротка, то средняя часть полосы не успеет размыться и на выходе получится ступень — пик с плоской вершиной, концентрация в максимуме которого равна исходной концентрации  $C_n$ . Этот тип хроматографии называют ступенчатой (рис. I.19), а само распределение концентраций ступенью. При достаточной длине колонки процесс размывания, распространяясь с обеих сторон полосы, дойдет до ее середины, и концентрация здесь начнет уменьшаться до значений, меньших  $C_n$ .

Эта чисто качественная картина позволяет сделать два вывода: концентрация в максимуме пика не может быть больше исходной, сколь большую пробу мы не вводили бы; если эта концентрация меньше предела детектирования, то пик нельзя обнаружить без использования методов концентрирования.

Типичная зависимость ширины пика и концентрации в его максимуме от объема вводимой пробы показана на рис. I.20. До некоторого предела концентрация в максимуме пропорциональна объему введенной пробы, а ширина пика и соответственно эффективность разделения от него не зависят. Форма пика при этом описывается уравнением Гаусса, ширина пика недостаточна для образования ступени. Концентрация в максимуме при этой форме пика дается соотношением

$$C_{\text{макс}} = q / (\sqrt{2\pi}\sigma), \quad (\text{I.65})$$

где  $q$  — количество вещества в пробе.

Значение  $q$  вычисляют по формуле:

$$q = V_n C_n.$$

Однако если мы будем продолжать увеличивать объем пробы, то, начиная с некоторого предела, пик начнет расширяться, а

рост концентрации в максимуме (и, соответственно, высота пика) уменьшается. Постепенно концентрация в максимуме сравнивается с предельным значением  $C_m$ , а между шириной пика и объемом пробы установится пропорциональная зависимость. Форма пика уже не будет описываться уравнением Гаусса, а будет представлять собой ступень.

Таким образом, при большой пробе полоса в конце колонки формируется из первоначальной полосы, ширина которой  $\Delta x_n$  возрастает на величину  $\Delta(\Delta x)$  за счет размывающих процессов в самой колонке. В итоге ширина полосы на выходе из колонки  $\Delta x_k$  будет равна:

$$\Delta x_k = \Delta x_n + \Delta(\Delta x_n).$$

Уширение пика и соответственно снижение эффективности за счет увеличения объема пробы называют объемной перегрузкой. Показано, что перегрузка не наблюдается при объеме пробы

$$V_n < aV_R/\sqrt{N_0},$$

где коэффициент  $a=0,5$ , если проба смешивается с подвижной фазой перед поступлением в колонку, и  $a=0,02$ , если дозируются чистые пары вещества. В области пропорциональности между  $\Delta x_k$  и  $V_n$  ширина пика (в единицах объема пропущенной подвижной фазы) определяется соотношением [26]

$$\Delta V = V_n + \sqrt{2\pi N_0} V_s \quad \text{при} \quad V_n > 3\sqrt{N_0} V_s, \quad (1.66)$$

причем неравенство является условием образования ступени.

Величина  $V_s = V_m/N_0$  — эффективный объем теоретической тарелки.

Пренебрегая небольшим увеличением объема удерживания в условиях перегрузки, можно определить зависимость числа теоретических тарелок от объема пробы:

$$N = 16 (V_m/\Delta V)^2 = 16 \left( \frac{V_m}{V_n + \sqrt{2\pi N_0} V_m/\sqrt{N_0}} \right)^2$$

после чего перейти к ВЭТТ:

$$H = L/N = L/16 [(V_n/V_m) + \sqrt{2\pi H_0/L}]^2,$$

где  $N_0$ ,  $H_0$  — число тарелок и ВЭТТ в отсутствие перегрузки.

Из последнего выражения видно, что снижение эффективности с ростом объема пробы зависит не только от последнего, но и от объема удерживания вещества: чем больше объем удерживания вещества, тем влияние объема пробы сказывается слабее.



## 2.5. КРИТЕРИИ РАЗДЕЛЕНИЯ И ИХ СВЯЗЬ С ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ И СЕЛЕКТИВНОСТЬЮ

Из описанной в предыдущих разделах физической картины процессов, протекающих в хроматографической колонке, можно заключить, что эти процессы сводятся к двум основным — раздвижение полос компонентов из-за различия в скорости их перемещения по колонке, вызванного различием сорбируемости; размывание полос компонентов, вызванное диффузионными и кинетическими процессами. Если первый процесс благоприятствует разделению, то второй его ухудшает. Возникает вопрос о введении критерия оценки суммарного эффекта разделения, учитывающего оба процесса. В качестве такого критерия используют разрешение.

Пусть в результате хроматографического разделения бинарной смеси получается хроматограмма, изображенная на рис. 1.21. Если  $l_1$  и  $l_2$  — расстояния на хроматограмме от момента ввода до максимумов первого и второго пиков, а  $\Delta s_1$  и  $\Delta s_2$  — ширины этих пиков, измеренные по методу касательных, то разрешение определится как отношение

$$R_s = 2(l_2 - l_1) / (\Delta s_1 + \Delta s_2), \quad (1.67)$$

в числителе которого стоит расстояние между максимумами пиков (степень раздвижения полос), а в знаменателе — среднее арифметическое ширины пиков (степень размывания полос). Чем больше разрешение, тем меньше перекрываются пики, тем лучше, отчетливее разделение, и соответственно, выше точность при количественном анализе. Увеличение разрешения может достигаться как за счет более значительного раздвижения пиков, увеличения разности  $l_2 - l_1$ , так и за счет сужения пиков, уменьшения их размывания.

Если пренебречь крайними частями пиков и принять их в виде треугольников, боковые стороны которых образованы касательными

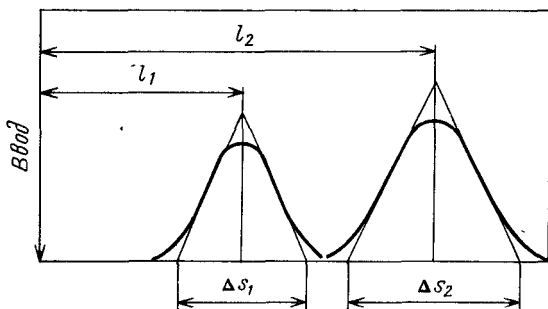


Рис. 1.21. Расчет  $R$  по хроматограмме

ми к точкам перегиба, то полное разделение будет наблюдаться при

$$(l_2 - l_1) = (\Delta s_1 + \Delta s_2) / 2,$$

т. е. при  $R_s = 1$ . Конечно, небольшое перекрывание за счет крайних частей пиков будет происходить и при этом значении  $R_s$ , однако оно существенно не повлияет на точность расчетов. Поэтому значение  $R_s = 1$  является граничным: при  $R_s < 1$  разделение неполное и следует приложить усилия для его увеличения, при  $R_s > 1$  имеется запас разделения. Иногда, например при определении примеси одного компонента в другом, такой запас разделения необходим, чтобы иметь возможность дозировать в колонку большие дозы смеси, обычно ухудшающие разделение; кроме того, в этом случае пик примеси часто проявляется на «хвосте» впереди идущего основного компонента и желательно максимально раздвинуть пики или их сильно сузить, чтобы четко выявить и точно обсчитать пик примеси. При анализе примеси значение  $R_s$  должно существенно превышать 1.

При анализе смесей, содержащих соизмеримые количества компонентов, обычно нет необходимости иметь большие значения  $R_s$ , поэтому при  $R_s > 1,5$  можно пойти на ухудшение разрешения, например, укоротив колонку, что позволяет получить существенный выигрыш во времени анализа.

Приведенная выше формула для разрешения является чисто расчетной, она позволяет подсчитать уже достигнутую степень разделения, но не позволяет ответить на вопрос, от чего зависит разрешение и какими путями его можно изменить. Чтобы ответить на этот вопрос запишем формулы для расчета числа теоретических тарелок, считая его одинаковым для обоих компонентов (для близких компонентов это условие достаточно хорошо выполняется):

$$N = 16 (l_1 / \Delta s_1)^2; \quad N = 16 (l_2 / \Delta s_2)^2.$$

Выразив из этих формул  $\Delta s_1$  и  $\Delta s_2$  и подставив в выражение для  $R_s$ , получим

$$R_s = 1/2 [(l_2 - l_1) / (l_2 + l_1)] \sqrt{N}. \quad (1.68)$$

В этой формуле поделим числитель и знаменатель на  $l_1$  и обозначим отношение  $l_2 / l_1 = t_{m2} / t_{m1}$  через  $\alpha_k$ ; кроме того, заменим  $N$  на  $L/H$ . После этого придем к окончательному выражению

$$R_s = 1/2 [(\alpha_k - 1) / (\alpha_k + 1)] \sqrt{L/H}, \quad (1.69)$$

устанавливающему связь между разрешением и другими показателями хроматографического разделения.

Из написанного выражения видно, что  $R_s$  зависит от трех величин:  $L$ ,  $H$ ,  $\alpha_k$ . Нет ничего неожиданного в том, что  $R_s$  увеличивается при удлинении колонки, однако необходимо учитывать, что  $R_s$  пропорционально не самой длине колонки, а только квад-

ратному корню из этой величины. Другими словами, увеличение длины колонки в 4 раза приводит к увеличению разрешения только в 2 раза. Это вытекает из закономерностей хроматографического процесса. Времена удерживания всех компонентов (как и пропорциональные им отрезки  $l_1$  и  $l_2$ ), а следовательно, и разность этих времен растут пропорционально длине колонки:

$$l_1 = l'_1 L; l_2 = l'_2 L; l_2 - l_1 = L (l'_2 - l'_1),$$

где  $l'_2, l'_1$  — значения  $l_2, l_1$  при  $L=1$ .

Но одновременно с положительным эффектом раздвижения максимумов пиков усиливается и отрицательный эффект размывания пиков, хотя последний слабее зависит от длины колонки:  $\Delta s^2 \sim HL$ , откуда  $\Delta s \sim \sqrt{HL}$ . Ясно, что разрешение  $R_s$ , равное отношению расстояния между максимумами пиков к их ширине, должно быть пропорционально  $\sqrt{L}$ .

Сходная зависимость наблюдается и между  $R_s$  и  $H$ : снижение  $H$  в 4 раза приводит к увеличению  $R_s$  только в 2 раза. В данном случае положение максимумов пиков от  $H$  не зависит, а ширины пиков пропорциональны  $\sqrt{H}$ .

Наиболее сильно зависит разрешение от коэффициента селективности колонки  $(\alpha_k - 1) / (\alpha_k + 1)$ .

После того как разделительный слой создан, он уже характеризуется определенным значением  $\Phi_k$ , которое не зависит от динамических условий проведения разделения, например от скорости и давления газа носителя, влияющих на эффективность  $H$ . Таким образом, разрешение  $R_s$  определяется как статическими характеристиками сорбционного слоя, измеряемыми величиной  $\Phi_k$ , так и динамическими условиями проведения разделения, влияющими на эффективность  $H$ .

Если использовать соотношение между коэффициентами селективности колонки и сорбента  $\Phi$ , можно выражение (1.69) переписать в виде [26]

$$R_s = 1/2 [(\alpha - 1)/(\alpha + 1)][k'/(1 + k')] \sqrt{L/H}. \quad (1.70)$$

Полученная формула связывает разрешение с длиной колонки, эффективностью, селективностью сорбента (неподвижной фазы), сорбционной емкостью сорбента  $k'$ . Чрезмерное увеличение последней нежелательно, так как увеличивает продолжительность анализа, однако значительное снижение может привести к уменьшению  $R_s$  ниже допустимого предела даже при использовании высокоселективных сорбентов и неподвижных фаз.

Формулу (1.70) можно использовать для расчета длины колонки, необходимой для полного разделения пиков. Если принять, что такое разделение происходит при  $R_s=1$ , подставить это значение в формулу (1.70) и выразить из нее  $L$ , то получим

$$L = 4 [(\alpha + 1)/(\alpha - 1)]^2 [(k' + 1)/k']^2 H \quad (1.71)$$

Определив из опыта на короткой колонке значения  $\alpha$ ,  $k'$  и  $H$ , которые от длины колонки не зависят, оценивают по формуле (I.71) необходимую длину колонки. Если последняя оказывается чересчур большой, это скорее всего связано с малым значением  $\alpha$ , которое можно увеличить, снизив температуру колонки (при этом, конечно, увеличится продолжительность анализа). Если снижение температуры не дает желаемого результата, необходимо использовать другой сорбент с большим значением  $\alpha$ .

Зависимость  $R_s$  от  $k'$  приводит к тому, что эффективность колонки, характеризуемая числом теоретических тарелок, часто не связана непосредственно с достигаемым разделением: при одном и том же значении  $\alpha$  более эффективная колонка может делить пики хуже, чем менее эффективная, но имеющая большее значение  $k'$  (например, за счет большего содержания неподвижной фазы на носителе). Наиболее показательный пример — капиллярные колонки, которые будучи значительно эффективнее насадочных не всегда обеспечивают лучшее разделение из-за относительно низких значений  $k'$ . Это побудило использовать для характеристики эффективности колонки еще одну величину — эффективное число теоретических тарелок  $N_{эф}$ , которое рассчитывается по формуле, аналогичной (I.62), но с заменой  $V_m$  на  $V_R$ :

$$N_{эф} = 16 (V_R / \Delta V)^2. \quad (I.72)$$

Если теперь, используя эту формулу, повторить вывод (I.68), то получим соотношение

$$R_s = 1/2 (\alpha - 1) / (\alpha + 1) \sqrt{N_{эф}},$$

в котором вместо  $\alpha_k$  фигурирует уже  $\alpha$  и в которое величина  $k'$  непосредственно не входит — она в неявном виде входит в  $N_{эф}$ . Эффективное число теоретических тарелок уже непосредственно связано с разрешением: чем больше  $N_{эф}$ , тем лучше делятся пики (при одинаковом  $\alpha$ ). Чаще всего эту величину используют в капиллярной хроматографии, но она вообще оказывается полезна при расчетах, поскольку в этом случае уменьшается число переменных, влияющих на  $R_s$ .

Если, используя (I.35), представить  $V_m$  в виде суммы  $V_R + V_0$ , подставить ее в уравнение (I.62) и поделить полученное выражение на (I.72), то найдем

$$N = N_{эф} [1 + 2 (V_0 / V_R) + (V_0 / V_R)^2],$$

а после замены отношения  $V_R / V_0$  на  $k'$  получим

$$N_{эф} = N [k' / (1 + k')]^2.$$

При больших значениях  $k' N_{эф} \approx N$ , но при малых  $k' N_{эф} \ll N$  и разделение ухудшается.

## ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

## Глава 1

## СОРБЕНТЫ И КОЛОНКИ ДЛЯ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

В газовой хроматографии применяют все три типа существующих колонок: насадочные (диаметр 3—5 мм), микронасадочные (диаметр 0,8—1,5 мм) и полые капиллярные (диаметром 0,1—0,8 мм) [1]. Насадочные колонки заполняют частицами сорбента (насадка) диаметром 0,1—0,5 мм. Принято считать, что достаточно однородный поток образуется, если соотношение диаметра колонки  $d_c$  к диаметру частиц  $d_p$  не менее 8. В газовой хроматографии реализуются процессы адсорбции и растворения, в связи с этим насадки представляют собой либо частицы адсорбента, либо частицы сорбента (носитель с нанесенной на него пленкой неподвижной фазы, в которой происходит растворение). В некоторых случаях происходят промежуточные смешанные процессы. Упрощенная схема колонки приведена на рис. II.1.

Как следует из уравнения Ван-Деемтера [см. уравнение (I.53)], эффективность разделительного устройства в существенной мере зависит от двух факторов: от диаметра частиц насадки  $d_p$  (член  $A$ ) и от однородности их упаковки (член  $B$ ). В связи с этим очевидно стремление использовать частицы размером 0,15—0,20 мм (с учетом оптимума перепада давления) и повышать степень однородности заполнения колонки частицами сорбента. Поскольку за

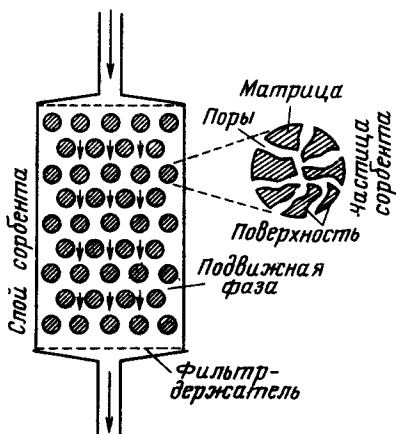


Рис. II.1. Упрощенная схема процесса в хроматографической колонке

рубежом преимущественно используют иную, чем у нас, систему размеров частиц, в табл. II.1 приведены сопоставления единиц измерения размеров частиц.

Таблица II 1 Соответствие размеров частиц

меш	мкм	меш	мкм	меш	мкм
25	707	50	297	90	149
30	595	60	150	100	125
40	420	70	210	120	115
45	324	80	177	140	105

В зарубежной практике наиболее часто используют частицы размером 60—80 меш (0,18—0,25 мм), 80—100 меш (0,12—0,18 мм), реже 100—120 меш (0,11—0,12 мм), тогда как в СССР нередко используют более широкие фракции 0,15—0,25 мм и 0,25—0,5 мм, что заведомо приводит к более низкой эффективности колонок.

### 1.1. АДСОРБЕНТЫ

Газоадсорбционную хроматографию используют реже, чем газожидкостную, главным образом из-за нелинейности изотерм адсорбции даже при низких степенях заполнения. Нелинейность изотермы вызывает нежелательные эффекты: изменение объемов удерживания при изменении объема пробы, асимметрию пиков, неполноту извлечения пробы. Другой причиной преимущественного использования газожидкостной хроматографии являются высокие удельная поверхность и энергия сорбции, что приводит к сильному удерживанию, особенно больших молекул. Вследствие этого адсорбенты большей частью используют для разделения газов при низкой температуре и низкомолекулярных соединений при высокой температуре. Разделение проводят, как правило, при температуре выше температуры кипения используемых соединений. Существуют также определенные трудности в стандартизации адсорбентов.

Среди достоинств адсорбентов — способность выдерживать высокие температуры и не создавать фона при детектировании примесей на ионизационных детекторах. Для адсорбентов характерна высокая селективность, что позволяет разделить газы и легкие углеводороды.

### 1.1.1. Минеральные (неорганические) адсорбенты

К числу неорганических адсорбентов относят активный уголь\*, силикагель, оксид алюминия, графитированную сажу и молекулярные сита. В газовой хроматографии преимущественно используют широкопористые силикагели, которые получают из обычного силикагеля высокотемпературной обработкой (до 700—950 °С) или гидротермальной обработкой с паром в автоклаве. Найден комплекс приемов, который позволяет получать любую разумную структуру силикагелевых адсорбентов как для газовой, так и для жидкостной хроматографии. Вместе с тем оксид алюминия получают лишь в нескольких модификациях, имеющих близкую к силикагелю удельную поверхность. Удерживание на силикагелях и на оксиде алюминия зависит от удельной поверхности, степени насыщения поверхности водой, условий предварительной термообработки, а также от свойств разделяемых соединений, в первую очередь их полярности, наличия водородных связей и др. Селективность оксида алюминия обусловлена присутствием на его поверхности льюисовских свободных кислот, связанных с ионами на поверхности. Для обоих адсорбентов насыщение водой приводит к существенному увеличению удерживания. В некоторых случаях применяют смесь этих насыщенных водой адсорбентов с диатомитовым носителем или стеклянными шариками. При использовании коротких колонок, заполненных частицами силикагеля диаметром 7—10 или 15—35 мкм, удавалось реализовать высокоскоростные режимы с получением более 2000 теоретических тарелок в 1 с.

Иногда изменение селективности достигается нанесением на силикагель неорганических солей или небольших количеств (порядка монослоя) малолетучих жидкостей. Благодаря закрытию наиболее энергетически сильных участков, общая энергетическая однородность повышается и удерживание и асимметрия пиков существенно уменьшается. При этом действие солей щелочных металлов аналогично воздействию полярных неподвижных фаз. Комплексообразующие соли типа нитрата серебра деактивируют поверхность и существенно изменяют селективность этих адсорбентов.

Свойства адсорбентов, нашедших наибольшее использование в практике газовой хроматографии, приведены в табл. II.2.

Среди других неорганических адсорбентов заслуживает внимания — графитированная сажа, получаемая нагреванием сажи в атмосфере инертного газа при 3000 °С. Вследствие этого удаляются все летучие примеси, происходит перекристаллизация углерода в кристаллы полиэдрической формы и поверхность становится почти свободной от ненасыщенных связей, электронных пар, сво-

---

\* Используется в редких случаях

Таблица II 2 Основные адсорбенты для газовой хроматографии

Тип сорбента	Наименование	Удельная поверхность, мг/г	Диаметр пор мм
Силикагель	Сферосил 400	300—500	8
	200	140—230	15
	075	75—125	30
	030	37—62	60
	015	18—31	125
	005	5—15	300
	Порасил В	125—250	10—20
	С	50—100	20—40
	Силохром С-80	70—90	.
	С-120	100—150	.
Графитированная термическая сажа	Карбопак С	12	
	В	100	1,3
	Карбосив	1000	1,5
	Карбосфер	1200	1,3
Натрия алюмосиликат	Молекулярное сито 4А		0,4
	13Х		1,0
Кальция алюмосиликат	Молекулярное сито 5А		0,5

бодных радикалов и ионов, т. е. в высшей степени энергетически однородной. В результате улучшается симметрия пиков. Графитированная термическая сажа является наиболее подходящим адсорбентом для разделения геометрических изомеров. Осуществляется также модификация поверхности графитированной сажи (адсорбенты карбопак В и карбопак С) добавками микроколичеств кислот типа пикриновой, фосфорной или неподвижных фаз. Принято считать, что при нанесении тонких пленок проявляются преимущественно их адсорбционные свойства. При использовании графитированной сажи реализуются наиболее существенные достоинства газoadсорбционной хроматографии по селективности и эффективности.

Большим классом адсорбентов являются молекулярные сита (цеолиты) как природного, так и синтетического происхождения. Их общая формула  $M_{2/m}O \cdot Al_2O_3 \cdot nSiO_2 \cdot xH_2O$  (где М — катион щелочных или щелочноземельных металлов). Структурными блоками алюмосиликатных матриц являются анионы  $[SiO_4]^{4-}$  и  $[AlO_4]^{-}$ , связанные через атомы кислорода. Избыток отрицательных зарядов компенсируется ионом щелочного или щелочноземельного металла. Диаметр пор в молекулярных ситах определяется размером атома катиона. Сама структура — микропористая и размер пор близок к размерам малых молекул. Поэтому цеолиты пригодны для разделения газов и самых легких углеводородов, а также позволяют осуществлять групповое разделение линейных олефинов от изо- и циклических аналогов. Цеолиты легко поглощают влагу и их свойства сильно изменяются.



В отличие от цеолитов, угольные молекулярные сита (карбосив) состоят из треугольных кристаллов, получающихся обычно пиролизом поливинилиденхлорида. Эти сита пригодны для разделения смесей газов, воды, формальдегида и  $\text{H}_2\text{S}$ . Из других минеральных адсорбентов иногда применяют бентониты (глины), оксиды хрома, железа, сульфат бария и др.

Специально для целей концентрирования разработан неорганический сорбент термосорб, который имеет верхнюю температуру использования  $500^\circ\text{C}$ , удельную поверхность  $30\text{--}50\text{ мг/г}$ . Сорбент позволяет концентрировать примеси из проб воды или воздуха.

### 1.1.2. Полимерные адсорбенты

Пористые полимерные сорбенты — наиболее распространенные сорбенты в газовой хроматографии [11]. Они обладают изменяющейся в широких пределах удельной поверхностью, достаточно большим суммарным объемом пор с однородным их распределением, достаточно высокой механической прочностью, обширной областью применения (от легких газов до высококипящих соединений). Особую значимость эти сорбенты приобрели при анализе водных растворов.

Пористые полимерные сорбенты различных типов получают методом суспензионной полимеризации, когда смесь мономеров и сшивающих агентов полимеризуется в среде инертного разбавителя в присутствии катализатора. Образующаяся в частицах на первых стадиях микроструктура геля постепенно преобразуется в матричную структуру, в которой внутренние полости заполнены инертным разбавителем. После высушивания и вакуумирования созданная пористая структура сохраняется и образуются достаточно однородные по размерам частицы сорбента с достаточно хорошей механической прочностью, которыми можно заполнять хроматографические колонки сухим методом. Выбрав подходящую систему мономеров, сшивающего и инертного разбавителя, можно получить полимерные сорбенты с различными функциональными группами и различной пористой структурой. В табл. II.3 приведены свойства наиболее распространенных зарубежных и советских полимерных сорбентов. Как видно из приведенных данных, свойства пористой структуры изменяются в очень широких пределах. В соответствии с общим правилом, чем больше размер пор, тем быстрее массообмен в порах и выше скорость анализа. Пористые полимерные сорбенты с размерами пор менее  $10\text{ нм}$  наиболее подходящи для анализа газов, тогда как сорбенты с размерами пор более  $10\text{ нм}$  позволяют разделять относительно высококипящие вещества.

Таблица II.3. Физические свойства пористых полимерных сорбентов

Сорбент	Тип	Насыпная плотность, г/см <sup>3</sup>	Удельная поверхность, м <sup>2</sup> /г	Средний радиус пор, нм	Температурный предел, °С
Порапак Р	Ст—ДВБ	0,39	225—350		250
Порапак Q	ЭВБ—ДВБ	0,35	500—700	4	250
Порапак П	ВПир	0,39	225—350	4	200
Порапак Р	ВПир	0,33	450—600	4	250
Порапак S	ВПир	0,35	300—450	5	250
Порапак Т	ЭГДА	0,44	250—300	10	200
Порапак PS	Силаниз. Р				
Порапак QS	Силаниз. Q			4—5	250
Хромосорб 101	Ст—ДВБ	0,30	50	300—400	275
Хромосорб 102	Ст—ДВБ	0,29	300—500	8	250
Хромосорб 103	ПСт	0,32	15—25	150—200	275
Хромосорб 104	АКН—ДВБ	0,32	100—200	30—40	250
Хромосорб 105	АЭ	0,34	600—700	20—30	250
Хромосорб 106	АСт	0,28	700—800	250	250
Хромосорб 107	АЭ		160—200	0,25	250
Полисорб 1	Ст—ДВБ	0,29	100—200	60—70	250
Полисорб 2	Ст—ДВБ	0,30	40—50	160—200	200
Полисорб 10	ПДВБ	0,23	300	80—100	250
Полисорбонитрил	АКН—ДВБ	0,34	80—100	60—70	200
Полисорбатазол	П—ВМП—ЭГДМА	0,32	50	60—70	250
Нитрополисорб-1	ПС-1 с NO <sub>2</sub>	0,30	100—250	40—50	200
Аминополисорб-1	ПС-1 с NH <sub>2</sub>	0,30	100—250	50—60	250
Нитрополисорб-2	ПС-2 с NO <sub>2</sub>	0,32	40—50	180—200	180
Аминополисорб-2	ПС-2 с NH <sub>2</sub>	0,32	30—50	200—300	250
Тенакс GC	ПДФФП	0,37	19		380
Хромосорб 108	АЭ		100—200	0,25	250

Ст — стирол, ДВБ — дивинилбензол, ЭВБ — этилвинилбензол, ВПир — винилпирролидон, ЭГДМА — этиленгликоль диметакрилат, ПСт — полистирол, АКН — акрилонитрил, АЭ — акриловый эфир, ПДФФП — *p*-2,6-дифенил-фениленоксид, П—ВМП—*p*-винил-3(5)-метилпиразол, ПС — полисорб

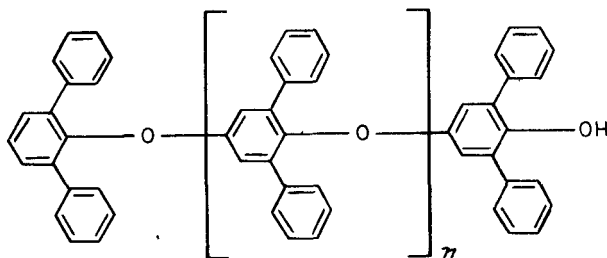
Представление об области преимущественного использования полимерных сорбентов дают данные табл. II.4.

Таблица II.4. Области применения полимерных сорбентов

Сорбент	Разделяемые соединения	Не пригодно для разделения
Хромосорб 101, порапак Р, полисорб-2	Углеводороды, простые и сложные эфиры, кетоны, спирты, альдегиды, жирные кислоты, гликоли	Амины, анилины
Хромосорб 102, порапак Q, полисорб-1, полисорб-10	Легкие и постоянные газы, низкомолекулярные кислоты, спирты, кетоны, альдегиды, гликоли, эфиры, нитроалканы, нитрилы	То же
Хромосорб 103	Спирты, альдегиды, кетоны, гидразины, амины, амиды	Вещества кислой природы, нитрилы, гликоли
Хромосорб 104, полисорбонитрил	Серосодержащие газы, оксиды азота, нитросоединения, нитрилы, кислоты	Амины, гликоли

Сорбент	Разделяемые соединения	Не пригодно для разделения
Хромосорб 105 порapak N, полисорбат	Большинство газов, водные растворы формальдегида, легкие углеводороды, отделение ацетилена	Гликоли, кислоты, амины
Хромосорб 106	Серосодержащие газы, кислоты и спирты $C_1-C_5$	Гликоли, амины
Полисорбат	Формальдегид в воде, ацетилен от легких углеводородов	То же
Полисорбатазол, хромосорб 107, порapak T, хромосорб	Газы, полярные соединения, вода, спирты, альдегиды, гликоли	
Порapak	Нормальные и разветвленные углеводороды, кетоны, галогенуглеводороды	Кислоты, амины
Порapak P	Простые и сложные эфиры, нитрилы, нитросоединения	Гликоли, амины
Тенакс, полифен	Концентрирование всех летучих органических соединений	

Существенно иным по природе является сорбент тенакс. Имеющиеся публикации позволяют получить представление о *p*-2,6-дифенил-фениленоксиде (молекулярная масса  $5 \cdot 10^5 - 10^6$ ):



Разделительные свойства его не слишком отличаются от свойств порapakа Q. Главная область использования — концентрирование из воздушных и водных сред.

В порядке возрастания полярности полимерные сорбенты располагаются в следующей последовательности: порapak Q, хромосорб 106 и 102, полисорб-1 < порapak P < хромосорб 101, полисорб-2 < порapak S, хромосорб 103 и 105, полисорбат < порapak N < хромосорб 107 и 108, порapak R, хромосорб 104, полисорбонитрил.

К сожалению, характеристики удерживания на полимерных сорбентах не отличаются большим постоянством, а некоторые из них взаимодействуют с компонентами анализируемых смесей, например порapak N реагирует с аминами, порapak Q и хромосорб 102 — с диоксидом азота.

Наряду с тенаксом обычные полимерные сорбенты в ограни-

ченных пределах можно использовать для концентрирования примесей.

Среди новых полимерных сорбентов следует упомянуть полисорбатазолы 142 [на основе N-винил-3(5)метилпиразола и дивинилбензола] и полисорбэпоксиды (на основе глицидилдиметакрилата и дивинилбензола). Полисорбатазол с небольшой удельной поверхностью является более полярным, чем хромосорб 104 и порapak T и изменяет полярность на 30% в интервале 50—150 °C. Сорбент пригоден для анализа газов, смесей жирных кислот и спиртов, определения примесей в воде и органических растворителях. В целом полимерные сорбенты характеризуются разнообразием решаемых с их помощью аналитических задач. Вместе с тем механизм удерживания на сорбентах этого типа все еще недостаточно ясен. Большей частью принято считать, что при низких температурах удерживание определяется в основном адсорбционными явлениями. При более высоких температурах поверхностный слой полимера переходит в некое студнеобразное полужидкое состояние без существенного нарушения структуры и вследствие этого удерживание определяется в основном процессами растворения. В некоторых случаях удерживание определяется обоими процессами — адсорбцией и растворением. Поэтому полимерные сорбенты занимают некоторое промежуточное положение между адсорбентами и сорбентами.

Применение пористых полимерных сорбентов ограничивается областью органических соединений с температурами кипения до 300 °C, для более высококипящих соединений время удерживания чрезмерно велико, а пики несимметричны. Важной особенностью большинства полимерных сорбентов является проявление проб воды в виде симметричного узкого пика, это обстоятельство делает их незаменимыми при анализе водных растворов.

По большинству компонентов эффективность колонок с полимерными сорбентами обычно ниже, чем колонок с близкими по полярности сорбентами, и H составляет 1—5 мм. Впрочем, многое зависит от исследователя, заполняющего колонки электризуемыми частицами полимерного сорбента, а также от степени однородности частиц. В последнее время появились зарубежные полимерные сорбенты под названием «хайсеп» с более высокой эффективностью (H до 0,5 мм), лучшей воспроизводимостью и меньшим временем кондиционирования.

Особое положение занимает полимерный сорбент тенакс GC. Он уникален по термической стабильности (375 °C) в изотермическом режиме. Тенакс является сильнополярным сорбентом. Одна из его особенностей — сильное удерживание воды (более  $C_6$ ), что позволяет определять в воде примеси углеводов  $C_2$ — $C_{16}$ , разлагать амины, гидроксилсодержащие соединения, нитрилы.

Класс полифункциональных сорбентов, полученных синтезом двух или нескольких полярных мономеров разной природы, обла-

дает высокой специфичностью межмолекулярных взаимодействий. К ним относят полисорбатазолы (сополимеры на основе N-винил-3(5)метилпиразола и этиленгликольдиметакрилата); полисорбакрилаты (сополимеры на основе бутилметакрилата и триэтиленгликольдиметакрилата) и чешские сфероны (сополимер этиленди- и оксиэтилметакрилата). Эти сорбенты отличаются высокой полярностью и пригодны для отделения парафинов от полярных соединений, разделения близкикопящих веществ, альдегидов, спиртов, кислот. Область их применения установлена не полностью.

Новые возможности в регулировании свойств полимерных сорбентов открывает химическое модифицирование, которое позволяет вводить в полимерную матрицу различные функциональные группы. Химическое модифицирование осуществляется при помощи полимераналогичных реакций хлорметилирования, нитрования, аминирования, сульфирования, фосфорилирования и др. При этом используют уже готовую матрицу полимерного сорбента с нужными структурными характеристиками. Среди полученных таким образом сорбентов привлекают внимание нитрополисорб ( $\text{NO}_2$ -группы), аминополисорб ( $\text{NH}_2$ -группы) и сульфополисорб ( $\text{SO}_3\text{H}$ -группы). Первый селективен к непредельным и ароматическим углеводородам, нитросоединениям, сульфополисорб высокоселективен к аминам, нитрилам и в качестве вычитающего селективного сорбента.

Большую группу высокоселективных полимерных сорбентов составляют иониты и их комплексонаты металлов. Сульфокатиониты в различных формах, легко получаемые самими аналитиками, позволяют решать самые разнообразные задачи, в том числе проводить анализ примесей неполярных соединений на очень коротких колонках. Комплексонатные полимерные сорбенты получают за счет координационного взаимодействия ионитов-комплекситов с ионами переходных металлов, таких как Ag, Hg, Cu. Поликомплексонат Ag обладает повышенной селективностью к ненасыщенным и ароматическим соединениям, поликомплексонат Cu позволяет разделять оксиды азота.

Таким образом, полимерные сорбенты, основные и модифицированные различными способами, представляют обширную группу сорбентов с широким разнообразием свойств пористой структуры и функциональных групп на поверхности, которые позволяют решать различные задачи хроматографического разделения и анализа.

## 1.2. НОСИТЕЛИ И НЕПОДВИЖНЫЕ ФАЗЫ

### 1.2.1. Носители

Носитель представляет собой относительно инертный адсорбент с низкой удельной поверхностью, на которой должна удерживаться неподвижная фаза в виде тонкой пленки равномерной толщины. Носитель должен быть механически прочным, иметь по возможности сферическую форму и макропористую структуру. Имеются носители минеральные и полимерные. Большинство минеральных носителей представляют собой переработанные диатомиты, являющиеся скелетами диатомии — ископаемых одноклеточных простейших организмов. Их исходная удельная поверхность приблизительно  $20 \text{ м}^2/\text{г}$ , состав достаточно однороден в разных местах:  $\text{SiO}_2$  — 90—92%;  $\text{Al}_2\text{O}_3$  — 4—5%,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  — 0,1—2%,  $\text{CaO}$  — 1—1,5%,  $\text{MgO}$  — 0,4%, летучих — 0,2—0,4%. Для получения носителя диатомитовую массу кальцинируют при  $900^\circ\text{C}$ . При спекании образуется вторичная структура пор, а удельная поверхность уменьшается. Полученный твердый материал дробят и рассеивают на однородные фракции. В зависимости от содержания примесей, в первую очередь железа, и режима кальцинирования получают два типа носителей: розовый и белый, второй имеет меньшие удельную поверхность, прочность и большее значение рН.

Наибольшее распространение в мировой практике получили носители типа хромосорб производства фирмы «Johns Manvill» (США). В нашей стране преимущественно используют носители ЧСФР типа хроматон и инертон, а также наши носители под названием «Цветохром». Основные свойства этих носителей приведены в табл. II.5.

Среди этих носителей хромосорб G выделяется большой плотностью, меньшей удельной поверхностью, большей инертностью.

Таблица II.5. Физические свойства основных носителей

Носитель	Плотность при свободном заполнении, г/мл	Плотность, г/см <sup>3</sup>	Удельная поверхность, м <sup>2</sup> /г	Объемная удельная поверхность, м <sup>2</sup> /мл	Максимальный % наносимой фазы	рН
Хромосорб G	0,47	0,58	0,5	0,29	5	8,5
Хромосорб P	0,38	0,47	4,0	1,88	30	6,5
Хромосорб W	0,18	0,24	1,0	0,29	20	8,5
Хромосорб A	0,40	0,49	2,7	—	25	7,1
Хромосорб 750	0,33	0,36	0,75	0,24	7	—
Хроматон H	—	—	3—4	—	30	7,5
Инертон	—	—	2,0	—	10	—
Порохром	—	—	2,5	—	30	7—8
Цветохром K	0,5	—	1,5—2,5	—	30	6—8
Диакром	0,38	—	4,0	0,6	30	8,5

На него можно нанести не более 5% неподвижной фазы. Его рекомендуется использовать для работы при высокой температуре и для разделения веществ высокой молекулярной массы и сложного строения. Наиболее инертен носитель хромсорб 750.

В соответствии с уравнением Ван-Деемтера (1.53) для получения более высокой эффективности стремятся использовать частицы малого размера, но поскольку при этом растет сопротивление потоку пропорционально  $d_p^2$ , то оптимален размер частиц 0,12—0,15 или 0,15—0,18 мм. При этом наибольшая эффективность достигается при максимально однородных по размерам частицах носителя. Обычно принято, что содержание основной фракции составляет 80%. Выпускают носитель высокой эффективности марки НР, в котором доля основной фракции составляет не менее 90%.

Носители раннего периода развития хроматографии были пригодны для разделения неполярных углеводородов, но при разделении полярных соединений на них наблюдалась асимметрия пиков, адсорбция образцов и даже разложение. Эти нежелательные явления обусловлены присутствием металлов и силанольных групп на поверхности диатомитовых носителей. Среди методов снижения активности носителя наиболее часто применяют два: обработку кислотой (для удаления металлов) и превращение силанольных групп на поверхности в силильные эфиры за счет реакций взаимодействия с диметилдихлорсиланом (DMDS) или гексаметилдисилазаном (HMDS) или комбинацию этих реагентов. Схема силанизации представлена на рис. 11.2. Однако часть силанольных групп на поверхности сохраняется. Силанизированные носители плохо смачиваются полярными фазами. В соответствии с обработкой носителя существуют три градации: NAW — необработанный (исходный); AW — промытый кислотой; AW — DMDS или AW — HMDS — промытый кислотой и обработанный диметил- или дихлорсиланом, гексаметилдисилазаном или другими силилирующими реагентами. Однако даже после обеих обработок диатомитовые носители не утрачивают свои активные центры полностью, что приводит к размыванию заднего фронта кислых и основных компонентов.

Для устранения этих «хвостов» носитель обрабатывают малыми количествами веществ более основных или более кислых, чем анализируемые соединения. Для разделения аминов, например, надо добавить несколько процентов КОН или полиэтиленмина и др. При анализе кислых соединений добавляют фосфорную кислоту. Более 90% всех разделений осуществляют на носителях на основе диатомитовых земель.

В некоторых случаях используют стеклянные шарики с экстра-низкой удельной поверхностью (максимальное содержание неподвижной фазы 0,5%), графитированную сажу (наносят небольшие количества полярных неподвижных фаз), а также силикагели и

Таблица 11.6. Примерная эквивалентность носителей различных типов

Тип носителя	«Джон Мэвилл»	«Аналабс»	«Апплайд Сайенс Лаборатори»	«Лакхема»	Завод диатомитов и др	«Супелко»
Необработанный тип NAW	Хромосорб N	Анахром		Хроматон	Цветохром	
	Хромосорб G		Газхром Q	Инертон	Динохром Н	
	Хромосорб Р	Анахром C22	Газхром	Хезасорб	Сферохром	
	Хромосорб А					
Полимерный	Хромосорб Т	Анахром	Флюропак 80		Полихром 1	
Обработанный кислотой тип AW	Хромосорб N	Анахром А	Газхром А	Хроматон N		Супелкон
	Хромосорб G					
	Хромосорб Р					
Силанизированный тип AW—DMDS или AW—HMDS	Хромосорб N	Анахром	Газхром Q	Хроматон	Цветохром G	Супелкон
	Хромосорб G	Анахром		Инертон		
	Хромосорб Р					
	Хромосорб 750					
Повышенной эффективности	Хромосорб НР	Анахром НР	Газхром НР	Инертон супер		Супелкопорт



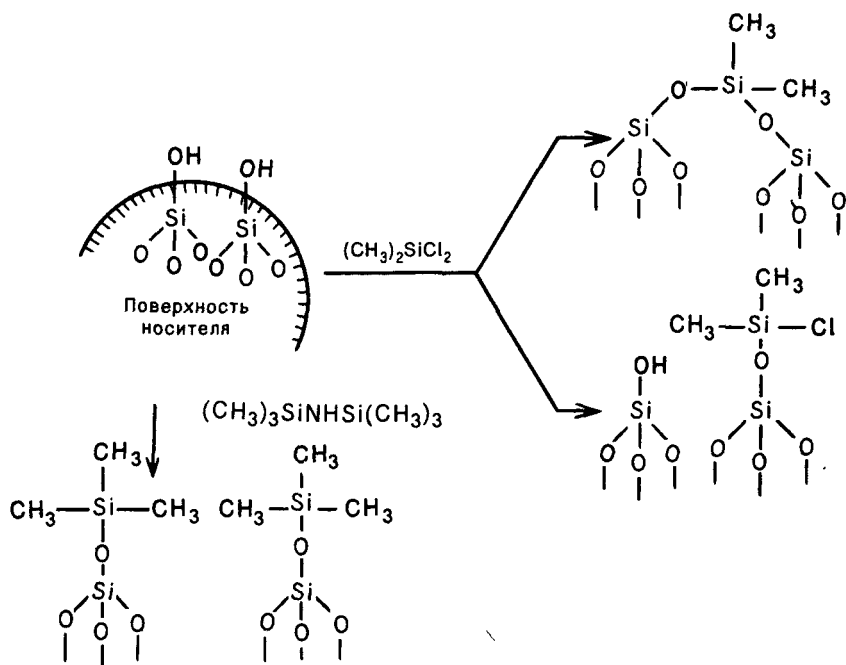


Рис. II.2. Обработка поверхности носителя силинизацией

полимерные сорбенты. На двух последних носителях с неподвижной фазой разделение осуществляется по сложному механизму, при котором роль адсорбционных взаимодействий велика. Такие сорбенты принято называть модифицированными адсорбентами (количество неподвижной фазы до 30%).

Наиболее инертными являются полимерные носители на основе фторполимеров, которые имеют достаточно высокую удельную поверхность, но плохо смачиваются полярными фазами. Ниже приведены основные сведения о полимерных носителях:

	Флуоропак 80	Тефлон 6	Хромо сорб Т	Полихром 1
Удельная поверхность ( $m^2/g$ ) . . . . .	1,3	10,6	8	12
Максимальное количество неподвижной фазы, % . . . . .	2—3	15—20	15—20	15—20
Максимальная температура, $^{\circ}C$ . . . . .	275	250	240	240

Для оценки эквивалентности различных носителей представлены данные в табл. II.6.

### 1.2.2. Неподвижные фазы

Как было отмечено выше, в газожидкостной хроматографии разделение обусловлено селективным взаимодействием между веществом и неподвижной жидкой фазой. Все вещества при этом проходят один и тот же путь и пребывают одинаковое время в газовой фазе, но разное — в жидкой. На молекулярном уровне в растворе происходят межмолекулярные взаимодействия, среди которых различные дисперсионные, индукционные, ориентационные и донорно-акцепторные, включая водородную связь и другие сильные взаимодействия. Общие представления об особенностях проявления этих сил приведены в табл. II.7.

Известно более 1000 неподвижных фаз, нашедших применение в газовой хроматографии. Стремление резко ограничить число применяемых неподвижных фаз неправомерно, поскольку именно возможность реализации различного типа межмолекулярных взаимодействий — сильная сторона газожидкостной хроматографии. Применение нашло около 100 достаточно часто используемых неподвижных фаз, из которых 20 используют примерно в 60—70% всех хроматографических анализов. Применение капиллярных хроматографических колонок с их высокой эффективностью в какой-то мере дало возможность снизить требования к селективности и сделать эти 20 фаз достаточными примерно для 80% разделений. Однако всегда найдутся задачи, для которых селективность каких-либо неподвижных фаз является уникальной.

По температурному пределу использования все неподвижные фазы можно разделить на 3 группы: низкотемпературные (до 100 °C); среднетемпературные (до 200 °C); высокотемпературные (до 350 °C).

Существенно различаются неподвижные фазы по своей полярности. Это не очень четкое понятие характеризует некоторый баланс одновременно проявляющихся сил различных типов, обусловленных наличием различных функциональных групп. Относительная полярность неподвижных фаз характеризуется величиной  $P$ , рассчитываемой по формуле Роршайндера:

$$P = 100 - 100 (q_1 - q_2) / (q_1 - q_2)$$

При этом полярность одной из фаз (полярного  $\beta, \beta'$ -оксидипропионитрила) принимали за 100%, а полярность другой (неполярного сквалана) — за 0%. В качестве стандартных веществ были взяты бутан ( $A$ ) и бутадиев ( $B$ ). В формуле  $q_1 = \lg (V_B/V_A)$  на колонке с  $\beta, \beta'$ -оксидипропионитрилом;  $q_2 = \lg (V_B/V_A)$  на колонке со скваланом;  $q_x = \lg (V_B/V_A)$  на колонке с исследуемой жидкой фазой. По этой шкале относительной полярности все неподвижные фазы делят на 4 группы: неполярные ( $P=0-5\%$ ), слабополярные ( $P=5-15\%$ ), среднеполярные ( $P=15-35\%$ ), сильнополярные ( $P=50-100\%$ ).

Таблица II.7. Основные типы межмолекулярных сил, характеризующих взаимодействие между веществом и неподвижной фазой

Тип сил	Характер сил	Формула	Примечание
Дисперсионные (силы Лондона)	Возникают за счет воздействия электрического поля, которое создается очень быстро изменяющимися мгновенными диполями, образующимися между ядрами и электронами, вызывая образование индуцированных диполей	$E_D = \frac{3\alpha_A\alpha_S I_A I_S}{2r^6(I_A + I_S)}$	Во всех системах вещество — раствор. Единственный тип взаимодействий между неполярными молекулами, независящий от температуры
Индукционные (силы Дебая)	Возникают за счет взаимодействия постоянного диполя вещества с поляризуемой молекулой растворителя и наоборот	$E_i = 1/r^6 (\alpha_S \mu_A^2 + \alpha_A \mu_S^2)$	Слабые, уменьшаются с ростом температуры. Наведенные диполь-дипольные взаимодействия не одинаковы и зависят от относительной ориентации молекул
Ориентационные (силы Кeesома)	Возникают в результате взаимодействия между двумя постоянными диполями	$E_o = \frac{-2\mu_A^2 \mu_S^2}{3r^6 kT}$	Уменьшаются с ростом температуры и приближаются к нулю при очень высоких температурах. Включает координационные взаимодействия между ионом металла и олефинами, перенос заряда и взаимодействие за счет водородных связей
Донорно-акцепторные	Химические взаимодействия, обусловленные частичным переходом электрона от заполненного орбитала к вакантному орбиталю молекулы-акцептора		

$\alpha$  — поляризуемость,  $\mu_A$ ,  $\mu_S$  — постоянные диполи вещества  $A$  и растворителя  $S$ ,  $I$  — энергия ионизации молекул,  $r$  — расстояние между диполями,  $k$  — постоянная Больцмана,  $T$  — абсолютная температура

Выбор неподвижной фазы зависит от полярности разделяемых веществ и от их способности образовывать водородные связи. Наблюдаемая разница в удерживании во многом объясняется взаимодействием сил, описанных в табл. II.7. Например, неполярные соединения обычно разделяются в соответствии с температурами их кипения на неполярной неподвижной фазе. В случае неполярной фазы полярные соединения удерживаются существенно меньше, чем неполярные, кипящие при одной и той же температуре. Удерживание полярных соединений увеличивается по мере роста полярности неподвижной фазы, и наоборот, время удерживания неполярных соединений возрастает с уменьшением полярности неподвижной фазы. Между крайними вариантами существует множество промежуточных, что позволяет регулировать разделение как путем выбора неподвижных фаз, так и путем изменения температуры. При высоких температурах преобладают дисперсионные силы и разделение осуществляется в соответствии с температурами кипения соединений.

В газовой хроматографии очень велика роль вклада в удерживание взаимодействия за счет образования водородных связей. Для их оценки приведем классификацию вещества по водородным связям. Известные классы веществ разбиты на группы в порядке убывания прочности водородных связей от многократного их проявления (класс I) до отсутствия (класс V):

I	II	III	IV	V
Вода	Спирты	Простые эфиры	$\text{CHCl}_3$	Насыщенные углеводороды
Гликоль, глицерин	Жирные кислоты Фенолы	Кетоны Альдегиды	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ $\text{CH}_3\text{CHCl}_2$	$\text{CS}_2$
Аминоспирты Оксикислоты	Первичные и вторичные амины	Сложные эфиры Третичные амины	$\text{CH}_2\text{ClCH}_2\text{Cl}$ $\text{CH}_2\text{ClCHCl}_2$ и т. п.	Меркаптаны Сульфиды
Амиды	Оксимы	Нитросоединения, не содержащие $\alpha$ -H-атомов		Галогенуглеводы, не входящие в класс IV, например такие, как $\text{CCl}_4$
Полифенолы	Нитросоединения с $\alpha$ -H-атомами Нитрилы с $\alpha$ -H-атомами $\text{NH}_3$ , $\text{HF}$ , $\text{N}_2\text{H}_4$ , $\text{HCN}$	Нитрилы, не содержащие $\alpha$ -H-атомов		

При комбинациях неподвижных фаз (НФ) и анализируемых соединений в зависимости от класса тех и других отклонения от закона Рауля различны:

НФ—АВ

I—IV  
I—V }

Всегда положительное отклонение; часто очень ограниченная растворимость, вещество не удерживается жидкой фазой

II—V } II—IV }	Всегда положительное отклонение; вещество обычно слабо удерживается жидкой фазой
III—IV	Всегда отрицательное отклонение; селективный растворитель; вещество хорошо удерживается жидкой фазой
I—I } I—II } I—III }	Положительное и отрицательное отклонение; должны определяться для каждого индивидуального соединения
II—II } II—III } III—III } III—V } IV—IV } IV—V } V—V }	Квазиидеальные системы; вещества разделяются по температурам кипения

Оценки удерживания по полярности и по водородным связям близи.

Важным понятием в хроматографии является понятие селективности неподвижных фаз. Принято считать, что неподвижная фаза селективна, если два соединения различных гомологических рядов с одинаковой температурой кипения удерживаются в различной мере. Ясно, что селективность неподвижной фазы обусловлена проявлением суммы недисперсионных сил.

Лежащие в основе варианта газожидкостной хроматографии процессы растворения исследуемых веществ в неподвижной фазе характеризуются термодинамическими параметрами. Наблюдаемое удерживание является результатом аддитивности сил межмолекулярного взаимодействия. Роршнайдер предложил использовать для характеристики неподвижных фаз разность индексов удерживания  $\Delta I$ :

$$\Delta I = I_{\text{полярное}} - I_{\text{неполярное}}$$

Одновременно каждое соединение и каждая фаза характеризуется пятью факторами, также позволяющими оценить неподвижные фазы:

$$I = ax + by + cz + du + es,$$

где  $a, b, c, d, e$  — факторы, характеризующие специфичность анализируемых соединений;  $x, y, z, u, s$  — константы Роршнайдера неподвижных фаз

Стандартные вещества, выбранные Роршнайдером, имеют следующие факторы:

	$a$	$b$	$c$	$d$	$e$
Бензол . . . . .	100	0	0	0	0
Этанол . . . . .	0	100	0	0	0
2-Бутанон . . . . .	0	0	100	0	0
Нитрометан . . . . .	0	0	0	100	0
Пиридин . . . . .	0	0	0	0	100

Для каждой неподвижной фазы

$$\begin{aligned} x &= \Delta I_{\text{бензола}} : 100, & y &= \Delta I_{\text{этанола}} : 100, \\ z &= \Delta I_{\text{бутанона}} : 100, & u &= \Delta I_{\text{нитрометана}} : 100, \\ s &= \Delta I_{\text{пиридина}} : 100. \end{aligned}$$

Мак-Рейнольдс выбрал в качестве стандартов другие 7 веществ: бензол, 1-бутанол, 2-пентанон, нитропропан, пиридин, 2-метил-2-пентанол, 2-октин. Константы Мак-Рейнольдса равны  $\Delta$ /соответствующих тесткомпонентов. Их значения не делят на 100. Значения констант Мак-Рейнольдса изменяются в пределах 0—1000, Роршайндера — от 0 до 10. Чем больше константа, тем больше удерживание. Константы Мак-Рейнольдса используют чаще.

Иную систему индексов удерживания предложил Ковач. Индекс удерживания соединения  $R$  рассчитывают по формуле (1.36)

Выбор неподвижной фазы для решения конкретной задачи разделения представляется многовариантной задачей и в немалой степени определяется характером разделяемых соединений и сложностью анализируемой смеси. Универсального рецепта не существует. Причиной этого является не только недостаточная проработанность теории растворов, которая не может дать математического выражения всех взаимодействий, выражаемых коэффициентами активности, но и то, что практически всегда в смеси присутствуют компоненты совершенно различной химической природы и расчеты удерживания при всей их трудности не дают четкой оценки возможностей каждой фазы разделить конкретную смесь. Межмолекулярные взаимодействия между растворенным веществом и неподвижной фазой слишком сложны, что не позволяет с достаточной точностью предсказывать удерживаемый объем. Поэтому невозможно создать простую последовательность неподвижных фаз для оценки удерживания всех анализируемых веществ в конкретной смеси.

В случае сложных смесей следует прежде всего рассмотреть возможность путем предварительного разделения с использованием физических или химических методов разделить эту смесь на некоторое число относительно простых смесей без потери компонентов и, следовательно, информации. Если эти возможности уже реализованы и анализируемая смесь все еще содержит большое число соединений разных классов, используют прежде всего колонку с неполярной, неселективной неподвижной фазой. В этом случае компоненты анализируемой смеси выходят из колонки в основном в порядке изменения температур их кипения. Это позволяет предварительно оценить сложность анализируемой смеси (число компонентов) и температурные пределы.

Если смесь состоит из 2—3 классов химических веществ и область температур кипения не слишком широка, то используют, наоборот, фазу высокой селективности. Тогда на хроматограмме сначала появляются соединения одного класса, затем другого и третьего, при этом нередко происходит и достаточно четкое разделение компонентов смеси в пределах каждого класса. Если же состав смеси совсем неизвестен, то надо последовательно разделить смесь на трех колонках с сорбентами различной полярности

от неполярной к сильнополярной. Это дает достаточно большой объем информации для выбора оптимальной неподвижной фазы. В трудных случаях, когда с использованием одной неподвижной фазы не удастся разделить смесь без наложения пиков друг на друга, применяют комбинацию различных сорбентов и колонок (многомерная хроматография).

В большинстве случаев имеется информация об анализируемой смеси и при определенном опыте работы в аналитической хроматографии можно ориентироваться в выборе подходящей в первом приближении разделительной среды. Кроме того, имеется колоссальный опыт тысяч хроматографистов, приведенный в статьях и обобщенный в многочисленных монографиях по хроматографии. В настоящее время создаются поисковые информационные системы, в память которых закладываются опубликованные данные по удерживанию отдельных компонентов и разделению конкретных смесей.

В западных странах ряд фирм, например голландская «Хром-пак», специализируются на изготовлении колонок под конкретную задачу анализа. Высоко ценится индивидуальный опыт каждого аналитика, наличие некоторой обобщенной информации позволяет ориентироваться в выборе неподвижных фаз и сорбента по их физическим свойствам и константам Мак-Рейнольдса и Роршнайдера (табл. II.8).

По химическому составу неподвижные фазы в своем большинстве принадлежат к следующим группам: углеводороды неароматические и ароматические; фталаты и фосфаты; эфиры простые и сложные, полиэфиры; жидкокристаллические соединения, полигликоли; силоксаны с неполярными, среднеполярными и полярными радикалами; нитрилы и нитрилэфиры.

Очень важен выбор растворителя при нанесении неподвижных фаз. Число используемых растворителей достаточно ограничено (6—8) и для каждой неподвижной фазы оптимальны 1—2 растворителя, при использовании которых на поверхность носителя наносится равномерная пленка неподвижной фазы.

Рекомендации по выбору неподвижных фаз для анализа определенных классов соединений приведены в табл. II.9.

Разработаны неподвижные фазы с высокой термостабильностью, примерно на 30—50 °С превышающей обычную (табл. II.10). В основном это силоксановые полимеры с различными функциональными группами. Способы их получения и модификации пока не указываются. Эти фазы в основном используют в капиллярных колонках, работающих при повышенных температурах.

Следует иметь в виду, что в западных странах аналитик крайне редко готовит сорбент в лаборатории сам, а обычно заказывает готовые сорбенты: неподвижная фаза (нужный процент) на определенном носителе с фиксированным размером частиц. Такой сорбент готовится по стандартной методике и обладает стандартными

Таблица 118 Константы Мак-Рейнольдса и Роршайндера

Неподвижная фаза	Температурные пределы	Растворитель	Константа Мак Рейнольдса			
			Бензол	1 бутанол	2 пентанол	нитро пропан
Сквалан	20—100	X, T	0	0	0	0
Парафиновое масло			11	6	2	7
Алиезон М	50—300	X, T	36	25	20	45
Алиезон L	50—300	X, T	36	23	21	44
Силикон SE-30	50—300	X	15	53	44	64
Силикон OV 1	100—350	X, T	16	55	44	65
Силикон DC 200	0—200	X, T	16	57	45	66
Силикон OV-101	0—350	X	17	57	45	67
Силикон E 52	50—300	X, T	32	72	65	98
Силикон SE 54	50—300	X, T	33	72	66	99
Силикон OV 3	0—350	X, T	44	86	84	128
Силикон OV 7	0—350	X, T	69	113	111	171
Дексил 400	50—400	T	72	108	118	166
Силикон DC 550	20—250	A, T	74	116	117	178
Силикон OV 11	0—350	X, T	102	142	145	219
Дионилфталат	20—150	A				
Халкомид M 18	40—150	M, X	75	255	122	182
Силикон OV 17	0,375	X, T	119	158	162	243
Укон HB-550X		X, M	129	268	161	233
Полипропилен	01—150	M	112	264	180	260
глицоль 2025	0—350	X	160	188	191	283
Полипропилен-глицоль 1025	0—125	M	130	290	174	258
Полипропилен-глицоль 425	0—200	M	177	362	227	351
Силикон OV-25	0—350	X	178	204	208	305
Полифениловый эфир	0—225	A	182	233	228	313
(6 колец)						
Бентон-34	0—180	T	167	271	318	262
Трикрезилфосфат	20—125	X, M	176	321	250	374
Силикон F-1			144	233	355	463
Силикон OV 210	0—275	A	146	238	358	468
Силикон XE 60	0—250	A	197	362	324	472
Силикон OV 225	0—265	A, X	228	369	338	492
Тритон	0—200	A	262	467	314	488
Игепал CO 990	100—200	M	259	461	321	482
SP 1000	50—270	X	319	501	350	469
Карбовакс 20 000 (20M)	60—225	X	322	536	368	572
Карбовакс 4000	60—200	X	324	586	363	568
Карбовакс 1500	50—175	X	347	607	412	623
FFAP	50—250	X	340	580	397	602
Карбовакс 1000	40—150	X	347	607	418	626
Реолекс 400	30—200	A	364	619	449	647
Диэтиленгликоль	0—200	A	378	603	460	665
Диэтиленгликоль	20—200	A	499	751	593	840
сукцинат						
Этиленгликоль-сукцинат	100—200	X	537	787	643	903
	125—150					



*для распространенных неподвижных фаз*

Константа Мак Рейнольдса			Константа Роршнандера				
Пиридин	2 метил 2 пентанол	2 Октин	Бензол	Этанол	2 Бутанон	Нитро метан	Пиридин
0	0	0	0	0	0	0	0
13	2	12	0,11	—	—	—	0,13
47	18	15	0,36	0,17	0,26	0,43	0,47
48	17	16	0,36	0,16	0,27	0,44	0,48
31	31	22	—	—	—	—	—
42	32	23	0,16	0,20	0,50	0,55	0,42
43	33	23	—	—	—	—	—
43	34	25	—	—	—	—	—
67	44	36	—	—	—	—	—
67	46	36	—	—	—	—	—
88	55	46	0,44	0,81	0,85	1,22	0,88
128	77	66	0,69	1,13	1,19	1,68	1,28
123	—	—	—	—	—	—	—
135	81	72	—	—	—	—	—
178	91	85	1,02	1,57	1,69	2,44	1,78
160	192	43	0,81	2,71	1,68	2,79	1,62
202	112	105	1,21	1,66	1,79	2,53	2,30
196	187	110	1,29	2,91	1,62	3,30	1,96
221	190	86	—	—	—	—	—
253	133	132	1,60	1,80	2,04	2,97	2,53
230	182	—	—	—	—	—	—
302	—	—	—	—	—	—	—
280	144	147	—	—	—	—	—
293	181	136	1,82	2,31	2,42	3,40	2,93
360	284	107	1,67	4,06	3,24	—	3,60
299	242	131	1,76	3,22	2,58	4,14	2,99
305	203	53	1,44	1,86	3,00	3,94	3,05
310	206	56	—	—	—	—	—
384	295	123	1,97	3,83	3,24	4,95	3,84
386	282	150	—	—	—	—	—
430	336	183	2,62	4,41	3,12	5,02	4,30
436	334	180	2,59	5,72	3,59	6,34	4,36
535	378	223	3,19	5,40	3,84	7,12	5,35
510	387	221	3,22	5,60	4,00	5,16	5,10
541	389	252	3,24	5,59	4,12	5,37	5,41
582	452	238	3,47	6,00	4,20	5,20	5,82
627	523	280	3,40	5,79	4,11	6,87	6,27
589	449	240	3,47	6,10	3,90	5,21	5,89
671	482	245	—	—	—	—	—
658	479	254	3,78	5,58	5,21	8,61	6,58
860	595	323	4,99	7,58	6,41	9,50	8,61
889	633	348	5,37	7,06	5,67	8,24	8,89

Неподвижная фаза	Температурные пределы	Растворитель	Константа Мак Рейнольдса			
			Бензол	1 бутанол	2 пентанон	нитро пропан
1,6-Гексакис-2-цианэтоксигексан	120—150	X, T	567	825	713	978
β,β'-Оксидипропионитрил	0/75		647	857	752	1028

Растворители А — ацетон М — метанол П — пиридин Т — толуол ЭА — этилацетат X — хлороформ

Таблица 11 9 Неподвижные фазы, применяемые для разделения соединений различных классов

Класс соединений	Неподвижная фаза
Ацетали	Укон В-550Х
Альдегиды	2-Этилгексильный эфир себаценовой кислоты, поролак
Алкалоиды	Силиконы Е-30, F-1
Амины алифатические	Карбовакс 400 + КОН
Амины ароматические	Карбовакс 20М + КОН
	Карбовакс 400 + КОН
	SP-1000*
Аминокислоты	Силиконы OV-1, OV 101
Вода в органических соединениях	Порапак Q, полисорб 1
Газы	Молекулярные сита, порапак Q
Галогенуглеводороды	Полисорб-10
Гетероциклические соединения	Укон В-550Х
	SP 1000
Душистые вещества	Укон В 550Х
Инсектициды	Силиконы SE-30, SE 52, SF-1
Изомеры о, м, п	SP-1000, бентон 34, жидкие кристаллы
Карбоксикислоты C <sub>1</sub> — C <sub>6</sub> до C <sub>18</sub>	SP 1000, порапак
	SP-1000
Кетоны	Укон В 550Х
Нитроароматические соединения	Силикон ХЕ 60, P-1000, FFAP
Нитрилы	SP-1000
Нитроалканы	SP-1000
Пестициды	Силиконы SE 30, SE 50, SP-1000'
Спирты C <sub>1</sub> — C <sub>5</sub>	Карбовакс 1500 на карбопаксе
	Хромосорб 102, полисорб 1
Высшие спирты	P 1000, FFAP
Спирты в воде	Порапак Q
Стероиды	F 1
Фенолы	SP-1000 на карбопаксе
Углеводороды алифатические	Апиезоны L, M, силикон Е 52
ароматические	бентон 34, силиконы Е 52, ХЕ-60
Хлоралканы	Эденол 1800
Эфиры	Силиконы, карбоваксы (ПЭГ)

\* SP 1000 близка к FFAP

Константа Мак-Рейнольдса			Константа Роршайндера				
Пиридин	2 метил 2 пентанол	2 Октин	Бензол	Этанол	2 Бутанон	Нитро метан	Пиридин
901	620	—	—	—	—	—	—
915	672	5,93	8,71	7,94	11,53	9,15	—

Таблица II 10 Некоторые новые высокотемпературные неподвижные фазы

Неподвижная фаза	Основа	Соответствующие обозначения близкой фазы	Полярность	Максимальная температура °C
BP 1	Диметилсилоксан	OV-1 OV-101 SE-30	Неполярная	320
BP 5	5% Фенилметилсилоксан	SE-52, -54	»	320
BP 10	7% Цианпропил	OV-1701	Малополярная	270
BP 225	7% Фенилметилсилоксан 25% Цианпропил 25% Фенилметилсилоксан	OV-285	Среднеполярная	240
BP 20	Полиэтиленгликоль	CW-20M	Полярная	250
HT	Карборансилоксан	—	Неполярная	460

свойствами. Кроме того, достаточно часто аналитик сразу заказывает колонку нужных размеров, заполненную необходимым сорбентом и имеющую гарантированную эффективность. Это не только экономит время аналитика, но и позволяет работать со стандартными колонками фиксированной высокой эффективности. Эти подходы начинают входить и в нашу практику.

### 1.2.3. Привитые неподвижные фазы

Такого рода сорбенты получают нанесением небольшого количества неподвижной фазы на носитель или адсорбент химическим или физическим методом. Число таких сорбентов пока относительно невелико [9]. В частности, сорбент дюрапак получают конденсацией нормальных спиртов или спиртов с разветвленной структурой, на пористых силикагелях с обработкой при высокой температуре в автоклаве. Другой прием получения привитых сорбентов заключается в силанизации поверхности носителя или адсорбента монофункциональными или мультифункциональными

силанами и в химической обработке неподвижными фазами через образование силоксановых связей и полимеризацию, результатом чего является прививка неподвижной фазы к поверхности. Третий способ включает связывание жидкой фазы с носителем путем высокотемпературной обработки смоченного носителя в слабом потоке газа-носителя. После такой обработки непрореагировавший остаток жидкой фазы смывают подходящим потоком растворителя. Количество привитой фазы соответствует 0,2—0,3%. В качестве фаз используют полиэтиленгликоль 20 М, полиэферы и поливинилсилоксаны. Полученные таким образом сорбенты названы бондпаки.

Вследствие того, что нанесенная таким образом пленка близка к монослойному покрытию, скорости массопередачи велики и использование таких сорбентов позволяет проводить высокоскоростной хроматографический анализ. Термическая стабильность этих сорбентов на 80—90 °С превышает термостабильность самих неподвижных фаз. Во избежание окисления следует очищать газ-носитель от следов кислорода. Механизм разделения на сорбентах с привитыми фазами достаточно сложен и определяется преимущественно процессами адсорбции.

Достоинством сорбентов этого типа является очень низкий унос, низкое удерживание, более высокая рабочая температура, большая инертность и более высокая эффективность колонок.

#### 1.2.4. Учет межповерхностной адсорбции в удерживании

Наблюдаемый характер удерживания в случае газожидкостной хроматографии не может быть объяснен полностью механизмом распределения между газовой и жидкой фазами. Возможна адсорбция на поверхности раздела газ — жидкость и газ — твердое тело. Удерживание описывается уравнением:

$$V_N = K_L V_L + K_{GL} S_{GL} + K_{GLS} S_{LS}, \quad (II.1)$$

где  $V_N$  — объем удерживания;  $K_L$  — коэффициент распределения в системе газ — жидкость;  $V_L$  — объем жидкой фазы;  $K_{GL}$  — коэффициент адсорбции на границе раздела газ — жидкость;  $S_{GL}$ ,  $S_{LS}$  — поверхности раздела в системе газ — жидкость и газ — твердое тело;  $K_{GLS}$  — коэффициент адсорбции на поверхности носителя.

Если  $K_{GL}$  и  $K_{GLS}$  — не пренебрежимо малы, то можно ожидать изменения удерживания в зависимости от свойств носителя, характеристик смачиваемости носителя, жидкой фазой, содержания неподвижной фазы. Следует учитывать также природу элюируемого вещества. Например, на полярной фазе для полярных веществ член  $K_{LS} S_{LS}$  больше, чем для углеводородов. При использовании полярной фазы адсорбция на поверхности раздела газ — жидкость более вероятна. Такая адсорбция существенно увеличивается, если природа фазы и вещества разная. Вообще, лишь

в относительно редких случаях удерживание определяется только процессом распределения (член  $K_L V_L$ ) и не зависит от покрытия поверхности носителя жидкой фазой. Адсорбция на носителе почти всегда имеет место, но в некоторых случаях она вносит существенный вклад в удерживание, в других — меньший, а в третьих — может совсем не учитываться.

Для снижения вклада адсорбционных явлений используют методы снижения адсорбционной активности за счет силанизирования носителей, нанесения малых количеств полярных веществ и др. Нельзя рассматривать адсорбцию в данном случае только как нежелательное явление. Разумная комбинация неподвижных фаз с активными носителями позволяет решать трудные задачи разделения, например, смеси изомеров легких углеводородов  $C_2 - C_5$  и др.

Не всегда нанесенная пленка неподвижной фазы существует в виде однородного слоя из-за препятствий к смачиванию (рис. II.3, а). На поверхности носителя могут образоваться капли или растянутые полусферы неподвижной фазы, обычно располагающиеся на гранях поверхности с малым проникновением в поры (рис. II.3, б). Даже в тех случаях, когда пленка распределяется равномерно по поверхности, она может быть в двух состояниях (рис. II.3, в). Молекулы фазы вблизи поверхности носителя образуют слой с энтропией растворения более низкой, чем для чистой жидкой фазы, причем этот слой не так уж мал. Например, для случая полярных фаз с их сильными взаимодействиями такой слой по массе может достигать нескольких процентов от массы носителя. Над этим поверхностным слоем размещается основной слой жидкой фазы. Вклад поверхностного слоя может быть учтен дополнительным членом к уравнению (II.1):

$$(1 - \delta) K_{DSL} S_{LS} + K_{SL} V_L,$$

где  $K_{CL}$  — коэффициент распределения для структурированного слоя,  $K_{DSL}$  —

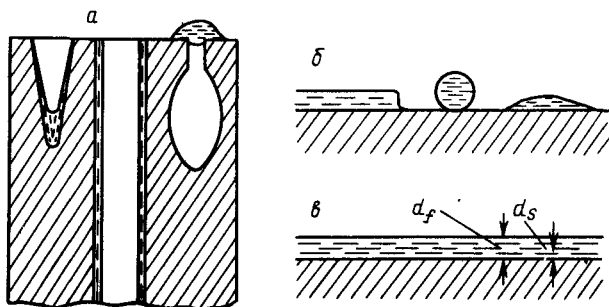


Рис. II.3. Типы покрытия поверхности носителя неподвижной фазой:

а — на различных типах пор, б — в зависимости от смачиваемости поверхности, в — структура покрытия с поверхностным слоем неподвижной фазы

коэффициент адсорбции на поверхности раздела газ — структурированный слой фазы;  $\delta$  — константа, значение которой равно 1 при  $d_s < d_f$  и 0 при  $d_s > d_f$ ;  $d_s$  — толщина структурированного слоя фазы,  $d_f$  — толщина пленки.

Расчет этих членов затруднен, требуются данные по крайней мере для 5 колонок с использованием сорбентов с различной толщиной покрытия слоем фазы.

В целом можно сказать, что вклад распределения в общее удерживание растет с увеличением количеств фазы и становится преобладающим в области более 10—15%, тем не менее даже в этой области адсорбция может составлять до 25% для неполярных фаз и существенно меньше для полярных жидких фаз. Таким образом, носитель и его свойства оказывают существенное влияние на удерживания, и учет этого влияния необходим для конкретных оценок.

### 1.3. ПОДВИЖНАЯ ФАЗА

В газовой хроматографии подвижную фазу рассматривают как инертную; считается, что она не вступает во взаимодействие ни с веществом, ни с неподвижной фазой. Следовательно, природа подвижной фазы — газа не оказывает влияния на процессы распределения или адсорбции — десорбции и газ-носитель не влияет на селективность. Его влияние на хроматографический процесс сказывается через эффективность колонки, которая зависит от разницы в скоростях диффузии веществ в газах [член  $B$  уравнения Ван-Деемтера (1.53)]. Природа газа-носителя влияет на продолжительность анализа, поскольку оптимум скорости потока различен для разных газов и время удерживания уменьшается с уменьшением коэффициентов диффузии вещества. Оказывает влияние также и определенное ограничение давления, обусловленное разницей вязкости газов. Принимаются во внимание и такие обстоятельства, как стоимость газа, его чистота, безопасность и обеспечение максимальной чувствительности используемых детекторов. Исходя из этого в газовой хроматографии используют ограниченный набор газов: азот, водород, аргон и гелий.

Для насадочных колонок в газовой хроматографии почти не имеет значения, какой газ-носитель использовать. Основным ограничением является перепад давления, с этой точки зрения водород с его низкой вязкостью (в 2 раза ниже, чем у He и N<sub>2</sub>) предпочтителен. С точки зрения эффективности азот несколько предпочтительней при низких температурах и скоростях газа-носителя, водород имеет оптимум эффективности при высоких температурах и при более высоких скоростях.

Нередко путают понятия скорость и расход (объемная скорость) газа-носителя. Практически в хроматографии измеряют только расход. В теоретических рассуждениях фигурирует линейная скорость. Расход  $\psi$  и скорость  $u$  связаны соотношением

$$u = 4\psi / (\pi d_f^2). \quad (11.2)$$

Для насадочных колонок  $\theta \approx 0,45—0,5$ . Расход приводят к нормальным условиям. Представление о связи между основными параметрами колонки и частиц сорбента и оптимальным расходом дают данные табл. II.11.

Таблица II 11. Связь между длиной колонки, ее диаметром, размером частиц сорбента и расходом газа-носителя

Диаметр колонки	Размер частиц (в мм) в колонках длиной		Расход газа носителя, см <sup>3</sup> /мин	
	до 3 м	более 3 м	N <sub>2</sub>	He или H <sub>2</sub>
2 мм	0,11—0,12	0,12—0,18	8—15	15—30
3 мм	0,11—0,12	0,12—0,18	15—30	30—60
4 мм	0,12—0,18	0,18—0,25	30—60	60—100

Для капиллярных колонок очевидны преимущества водорода в качестве газа-носителя, а именно с точки зрения эффективности, т. е. получения наибольшего числа эффективных тарелок, значение  $N_{\text{эфф}}$  для водорода достижимо при более высокой линейной скорости по сравнению с азотом. Это имеет особое значение при использовании режима программирования температуры: для азота продолжительность анализа в 2—2,5 раза больше, чем для водорода с получением примерно одинакового разделения компонентов смеси. Что касается взрывоопасности водорода, то принято считать, что условия взрыва никогда практически не создаются.

Иногда в газ-носитель добавляют небольшие количества аммиака, муравьиной кислоты, паров воды и др. Это в некоторых случаях улучшает форму пиков, повышает селективность или чувствительность детектирования.

#### 1.4. КОЛОНКИ

Колонка является одним из основных узлов хроматографа, ее задача — разделение смеси на отдельные компоненты или, точнее, серии бинарных смесей компонент — подвижная фаза. Наличие этого разделительного узла, входящего в состав хроматографа, является особенностью, выделяющей хроматографию среди других физико-химических методов анализа и определяющей ее способность анализировать многокомпонентные смеси. Без разделительного узла физико-химические методы, основанные на зависимости физико-химическое свойство — состав, могут применяться для анализа бинарных смесей и лишь в отдельных случаях смесей нескольких компонентов. После разделения многокомпонентной смеси на серию бинарных может быть легко применен прибор для

регистрации состава по физико-химическому свойству — детектор.

В зависимости от способа размещения неподвижной фазы и соответственно организации внутреннего пространства хроматографические колонки можно разделить на две большие группы: капиллярные и насадочные. Рассмотрим основы конструирования, а также преимущества и недостатки этих типов колонок.

#### 1.4.1. Капиллярные колонки

Различают три основных типа капиллярных колонок: 1) колонки, содержащие неподвижную фазу на гладких стенках — колонки WCOT или КОГС; 2) колонки, содержащие на стенках слой пористого сорбента — колонки PLOT или КОПС; 3) колонки, содержащие на стенках твердый носитель, пропитанный неподвижной фазой — колонки SCOT.

В настоящее время происходит бурное развитие капиллярной хроматографии, которая вытесняет насадочную из многих областей анализа, особенно анализа многокомпонентных смесей. Это вызвано не только техническим освоением метода, но и определенными преимуществами, которые дает применение капиллярных колонок. Такие колонки обладают высокой проницаемостью и высокой эффективностью, значение ВЭТТ может достигать на них 0,12—0,15 мм, а длина до 1000 м, хотя, конечно, реально применяемые колонки значительно короче и обычно не превышают 30—50 м. Это дает возможность получать на капиллярных колонках эффективность разделения, измеряемую миллионами теоретических тарелок, в то время как на насадочных она не превышает десятков тысяч, т. е. на два порядка ниже.

Отношение  $\epsilon/\kappa$  для капиллярной колонки больше, чем для насадочной, поэтому величина  $\Phi_k$  [см. (1.39)] ниже, однако капиллярные колонки, особенно для хорошо удерживающихся веществ, обладают большей разделительной способностью, чем насадочные. Большое отношение  $\epsilon/\kappa$ , ухудшая разделительную способность, в то же время уменьшает время удерживания, что позволяет сокращать продолжительность анализа  $t$  и снижать температуру разделения; последнее благоприятно сказывается на анализе реакционных и термолабильных соединений. Уменьшению продолжительности анализа способствует также и то обстоятельство, что минимум на кривой Ван-Деемтера для капиллярных колонок расположен в области больших скоростей газа, а наклон кинетической ветви кривой меньше, что позволяет без ущерба для разделения применять большие скорости газового потока. Значения критерия  $Rt^{-3}$ , который характеризует как разрешение  $R$ , так и продолжительность анализа  $t$ , для веществ с  $\alpha=2,0$  составляют у лучших насадочных колонок 2,1, микронабивных 4,1, КОПС — 4,6, КОГС — 9,0, т. е. последние являются самыми быстроедействующими.



К этому же выводу можно прийти, если сравнить число эффективных теоретических тарелок в единицу времени  $N_{\text{эф}}/t_R$ . У капиллярных колонок эта величина составляет 40—100  $\text{с}^{-1}$ , достигая у лучших колонок 2000  $\text{с}^{-1}$ , а у насадочных в 10—20 раз ниже. При работе трех колонок — набивной (2,4 м · 2,2 мм), КОГС (46 м · 0,25 мм) и КОПС (15,2 м · 0,5 мм) в оптимальном скоростном режиме значения  $R$  для пары веществ метилстеарат — метилолеат составили 1,54; 7,06 и 4,09 соответственно, а время удерживания второго компонента 35,6; 51,7; 23,0 мин. Увеличивая скорость газа-носителя и получая на капиллярных колонках значение  $R=1,54$ , продолжительность анализа сократили на КОПС до 3,25 мин, а на КОГС до 2,46 мин. Однако эти преимущества капиллярных колонок проявляются только для веществ с большими или средними значениями коэффициентов распределения, для анализируемых соединений с малыми значениями этих коэффициентов лучшие результаты дают насадочные или микронабивные колонки.

К недостаткам капиллярных колонок относят значительно меньший объем вводимой пробы, что затрудняет их использование для анализа микропримесей, недолговечность, относительно плохую воспроизводимость и сложность в эксплуатации. Вследствие этого в практике заводских лабораторий капиллярные колонки применяют мало. Капиллярные колонки большого диаметра (до 0,5 мм) с толстыми слоями неподвижной фазы, проигрывая в эффективности по сравнению с обычными капиллярными колонками, дают выигрыш в селективности за счет увеличения отношения  $\kappa/\epsilon$ , позволяют дозировать более значительные объемы пробы, успешно делить слабоудерживающиеся соединения.

Большинство капиллярных колонок изготавливают из стекла, которое обладает наименьшей адсорбционной и каталитической активностью среди всех применяемых материалов. Хрупкость стекла компенсируется тем, что стеклянные капилляры с чистой внутренней поверхностью легко изготовить в лаборатории. Металлические капилляры, главным образом из нержавеющей стали и меди, применяют в основном для анализа углеводородов, а из полимерных материалов не применяют почти совсем.

С 1977 г. в практике газовой хроматографии начали применять капиллярные колонки из кварца. Их преимущество по сравнению с обычными стеклянными капиллярами связано прежде всего с высокой чистотой кварца, особенно синтетического: содержание оксидов металлов в природном кварцевом стекле на 2 порядка ниже, чем в обычном, а в синтетическом кварце на порядок ниже, чем в природном. Между тем, оксиды металлов, главным образом щелочных, алюминия, железа и бора, легко взаимодействуют с молекулами-донорами электронов, которые элюируют в виде несимметричных пиков; сильные основания, например амины, могут

хемосорбироваться и вообще не выходить из колонки. Для снижения содержания металлов на внутренней поверхности стеклянных капилляров, последнюю обрабатывают, однако приемы такой обработки сложны, требуют высокой квалификации персонала.

Другой особенностью капиллярных колонок из кварца является низкое содержание гидроксильных групп, которые способны к образованию водородных связей с молекулами разделяемых веществ. Высокая температура вытяжки кварцевых капилляров способствует отщеплению воды от соседних силанольных групп с образованием силоксановых мостиков; необратимое отщепление воды происходит при температурах, превышающих 800 °С. Если гидроксильрованный пирекс содержит 2,84 гидроксильных групп на 1 нм<sup>2</sup> поверхности, а дегидроксильрованный — 0,36, то у синтетического кварца поверхностная концентрация гидроксильных групп составляет всего 0,21. Пониженное содержание гидроксильных групп способствует успешному разделению веществ, носящих основной характер.

Третьей особенностью кварцевых капилляров, облегчающих манипулирование с ними, является их большая гибкость и способность упруго выпрямляться. Кварцевый капилляр, в отличие от стеклянного, вытягивается и наматывается на катушку. Снаружи кварцевый капилляр покрывают полиимидным или полиамидным лаком, изолирующим его от атмосферы и влаги, которая способствует ломке колонок на дефектах. Благодаря большой гибкости при работе с кварцевыми капиллярами не возникает никаких трудностей при подсоединении концов колонки к детектору и испарителю (к обычным стеклянным колонкам рекомендуется приклеивать концы из отрезков кварцевого капилляра). Участок кварцевой капиллярной колонки легко согнуть в виде U-образной охлаждающей ловушки, его можно упруго сгибать, не боясь поломки, как в случае стеклянных капилляров.

Благодаря высокой инертности на кварцевых капиллярах удалось разделить смеси, не разделяемые на колонках из обычного стекла: высококипящие полярные вещества — амины и серосодержащие соединения, моносахариды и связанные сахара после их оксиметилирования и триметилсилирования, цитокинины в виде триметилсилильных производных и др.

Применяют кварцевые колонки с поперечно сшитыми неподвижными фазами, которые характеризуются высокой эффективностью. Несмываемость таких неподвижных фаз дает возможность дозировать большие объемы проб, с помощью растворителей из таких колонок можно удалить накопившиеся в них нелетучие вещества. Поскольку поперечно сшитые фазы менее летучи, «шум» колонки получается существенно ниже.

Имеются и некоторые трудности в использовании кварцевых капилляров, связанные прежде всего с относительной трудностью их получения и дороговизной. Наличие кварцевых капиллярных

колонок не исключает применения других материалов для изготовления капиллярных колонок.

Помимо готовых капиллярных колонок, выпускаемых с нанесенной фазой, потребитель может и сам изготовить стеклянную капиллярную колонку, приобретя для этой цели устройства для вытягивания капилляра и для нанесения неподвижной фазы. В СССР оба эти устройства выпускаются СКБ ИОХ АН СССР. Принцип вытягивания капилляра достаточно прост: стеклянная трубка-заготовка с внешним диаметром от 10 до 13 мм и толщиной стенок от 1,3 до 1,5 мм парой роликов подается внутрь печи, где стекло размягчается. Другая пара роликов тянет уже готовый капилляр из горячей зоны, затем этот капилляр направляется в изогнутую нагретую трубку, где вновь размягчается, изгибается и на выходе принимает форму спирали, которая наматывается на приемник. Варьирование скоростей вращения подающих и принимающих роликов позволяет изменять размеры получающегося капилляра. В устройстве СКБ ИОХ АН СССР температура в печи может меняться от 50 до 1100 °С и устанавливается в зависимости от сорта стекла; скорость вытягивания капилляра от 3,2 до 5,45 м/мин, диаметр витка спирали 120 мм, отклонение внутреннего диаметра по длине колонки на 50 м не более 0,02 мм при внутреннем диаметре 0,3 мм.

Установки для изготовления кварцевых капиллярных колонок сходны по принципу с установками для получения капилляров из обычного стекла. Исходная трубка подается также в нагреватель, температура в котором достигается 2000 °С. Вытягиваемый из трубки капилляр пропускают через емкость с защитным лаком, имеющую в нижней части фильеру, а потом через сушильную печь, нагретую до 200—400 °С. Капилляр получается прямым и наматывается на катушку.

Нанесение неподвижной фазы — наиболее сложная операция в приготовлении капиллярных колонок. Существует два основных способа нанесения — динамический и статический. При первом способе через колонку продавливают раствор неподвижной фазы в виде столбика жидкости, при этом на стенках остается пленка этого раствора. Затем растворитель отгоняют потоком газа-носителя при нагреве капилляра. В статическом методе весь капилляр заполняют раствором неподвижной фазы, один его конец закрывают, а второй медленно вводят в горячую зону, где растворитель испаряется. Считается, что второй метод имеет преимущества, так как поток паров растворителя очищает поверхность капилляра от адсорбированных веществ, в результате чего улучшается смачиваемость капилляра неподвижной фазой. Однако непосредственное нанесение неподвижных фаз на стеклянные капилляры обычно не дает положительных результатов из-за плохой смачиваемости, в результате чего фаза не растекается в виде тонкой пленки, а собирается в капли. Поэтому перед нанесением

фазы внутреннюю поверхность капилляра обрабатывают различными корродирующими агентами: фторо- и хлороводородом, метилтрифторхлорэтиловым эфиром и др. В результате такой обработки на внутренней поверхности капилляра образуется рыхлый слой кремнезема, более равномерно смачиваемый неподвижными фазами. Этой же цели служит отложение на поверхности пористых слоев графитированной сажи, кремнезема, карбоната бария.

### 1.4.2. Насадочные колонки

Насадочные колонки изготавливают главным образом из нержавеющей стали и стекла. Колонки из нержавеющей стали, естественно, прочнее, проще в эксплуатации, легче подсоединяются к подводным коммуникациям, однако они могут вызывать каталитическое разложение некоторых веществ. Поэтому анализ довольно большого количества соединений рекомендуют проводить на стеклянных колонках. К таким веществам относятся, например, многие высокомолекулярные соединения, с которыми имеют дело в биомедицинских исследованиях (стероиды, наркотики, продукты метаболизма, метиловые эфиры жирных кислот и др.), пестициды, летучие компоненты крови, ароматические вещества пищевых продуктов и напитков, загрязнения в воде и прочие. Преимуществом стеклянных колонок является также то, что качество их заполнения можно контролировать визуально. В настоящее время по широте использования стеклянные колонки, пожалуй, преобладают над металлическими. Относительно редко применяют колонки из полимерных материалов.

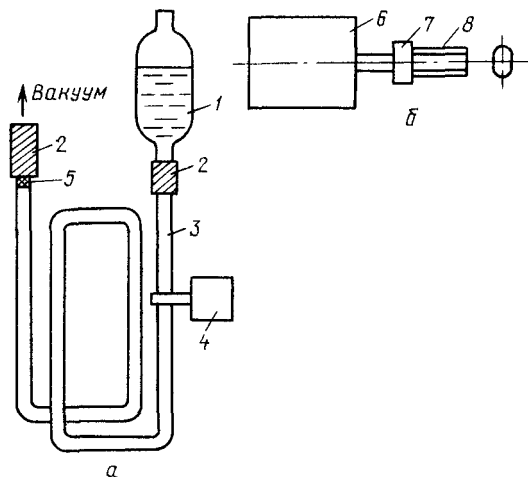
В большинстве случаев стальные колонки изготавливают в виде U-образных секций или спиралей; стеклянные, как правило, в виде спиралей с одинаковым диаметром витков (цилиндрические спирали). Подсоединяют колонку к детектору и испарителю по-разному в зависимости от материала колонок. Обычно используют штуцеры с накидными гайками. Металлические колонки уплотняют съемными металлическими конусами, надеваемыми непосредственно на колонку перед ее подсоединением. Стеклянные колонки уплотняют кольцами из силиконовой резины и тефлоновыми конусами.

Заполняют насадочные колонки, используя водоструйные или форвакуумные насосы на выходе колонки, а также с помощью вибрации (рис. II.4). Некоторые фирмы прилагают к своим хроматографам специальные вибраторы в виде электромотора со скошенной осью, прижимаемой к стенке колонки во время заполнения. Особых сложностей заполнение насадочных колонок при обычных аналитических применениях не вызывает.

Если диаметр насадочной колонки оказывается меньше 2 мм, такую колонку относят к микронасадочным. Последние обладают более высокой эффективностью, поскольку с изменением диаметра

Рис. 11.4. Заполнение газохроматографической насадочной колонки (а) и схема вибратора (б):

1 — емкость с сорбентом;  
2 — резиновый шланг; 3 — колонка;  
4 — вибратор; 5 — тампон из стекловаты; 6 — электромотор;  
7 — переходная муфта, 8 — скошенная ось



ускоряется процесс радиального перемешивания и соответственно снижается влияние на эффективность неоднородностей по сечению колонки. Более пологий наклон правой ветви кривой Ван-Деемтера позволяет применять более высокие скорости газа-носителя, снижая тем самым время анализа и температуру разделения. При использовании микронасадочных колонок уменьшаются размеры аппаратуры, расход газа-носителя, тепловая инерция колонок. При заданной степени разделения анализ на микронасадочных колонках протекает быстрее, чем на обычных, что делает целесообразным их применение при экспресс-анализе, а также при использовании промышленного хроматографа в системе автоматического регулирования промышленными процессами, где важен быстрый отклик аналитической системы на изменение состава.

Микронасадочные колонки имеют и некоторые преимущества перед капиллярными: более благоприятное отношение  $\varepsilon/\kappa$  и, соответственно, увеличение селективности; возможность дозирования больших проб; легкость в применении широкого ассортимента неподвижных фаз, в том числе и полярных; лучшее разделение слабосорбирующихся соединений; простота осуществления адсорбционного варианта хроматографии и возможность использования любого адсорбента. Однако микронасадочные колонки обладают меньшей проницаемостью, чем капиллярные, и при их использовании требуются большие давления на входе. Следует отметить, что микронасадочные колонки применяют относительно редко, хотя известны они с начала 60-х годов, значительно уступая в этом отношении как обычным насадочным, так и капиллярным колонкам. Это связано, по-видимому, с тем, что, занимая некоторое промежуточное по свойствам положение между наса-

дочными и капиллярными колонками, микронасадочные не имеют своих ярко выраженных областей использования. Техника их применения — само приготовление, организация газовой схемы — достаточно сложны и требуют специального оборудования, сходного с используемым в капиллярной хроматографии. В этом отношении они значительно уступают обычным насадочным колонкам, применение которых значительно проще. В то же время по способности делить многокомпонентные смеси, особенно полярных и высококипящих веществ, они уступают капиллярным колонкам. В зависимости от диаметра трубки, размера и характера частиц сорбента микронасадочные колонки изготавливаются по-разному.

Микронасадочные колонки диаметром 0,6—2,0 мм получают либо непосредственно заполняя трубку готовым сорбентом, либо заполняя ее твердым носителем с последующим нанесением неподвижной фазы фронтальным методом. Микронасадочные колонки с диаметром менее 0,5 мм получают, заполняя стеклянную трубку адсорбентом или твердым носителем и вытягивая затем из нее капилляр. В последнем случае на твердый носитель затем наносят фазу фронтальным методом.

Обычно для заполнения колонок применяют сорбент зернением около 100 мкм, однако в последние годы при заполнении микронасадочных колонок стали применять частицы диаметром менее 100 мкм. При этом отмечают очень высокую эффективность получаемых колонок, превышающую 10 000 т. т/м. Так, в одной из работ на колонке, заполненной силикагелем с диаметром частиц 7 мкм, достигнута эффективность 45 000 т. т/м. Однако при таком размере частиц сорбента давление на входе в колонку составляет несколько МПа, достигая иногда 15 МПа, что требует видоизменения газовой схемы серийно выпускаемых хроматографов. Сорбент засыпают непосредственно в готовую трубку. Например, при заполнении кварцевых капилляров диаметром от 0,4 до 0,15 мм частицами диаметром от 100 до 5 мкм использовалось совместное воздействие газового потока и вибрации. Такие колонки обычно бывают не длиннее 1 м.

Техника использования микронасадочных колонок сходна с техникой использования капиллярных — применяют те же системы ввода и способы детектирования.

## РЕГУЛИРОВАНИЕ ГАЗОВЫХ ПОТОКОВ

Одним из главных компонентов процесса газохроматографического анализа является газ-носитель. Несмотря на то что применяемые в газовой хроматографии газы-носители являются, как правило, инертными, природа газа-носителя может оказывать значительное влияние как на характеристики детектора, так и на процесс разделения в хроматографической колонке. Некоторые типы детекторов в газовой хроматографии работают только с определенным типом газа-носителя, например аргоновый с  $\text{Ag}$ , гелиевый с  $\text{He}$ . Другие имеют разную чувствительность при использовании различных газов-носителей, например детектор по теплопроводности (ДТП) с газами-носителями  $\text{He}$  и  $\text{N}_2$  или фотоионизационный (ДФИ) с  $\text{N}_2$  и воздухом. Для третьих необходимо применение нескольких газов с целью идентификации анализируемых веществ, например для детектора плотности (ДП) —  $\text{N}_2$  и  $\text{CO}_2$  или смеси газов для обеспечения более высокой линейности; для электрозахватного детектора (ДЭЗ) с импульсным питанием —  $\text{Ag} + 5\% \text{CH}_4$ .

Для получения оптимальной эффективности разделения в хроматографической колонке необходимо иметь газ-носитель с оптимальными коэффициентами диффузии в нем анализируемых компонентов, небольшой вязкостью, связанной с перепадом давления в колонке, и значительно меньшей сорбционной способностью по сравнению с анализируемыми веществами.

Одно из основных требований к газу-носителю — инертность по отношению к разделяемому веществу, растворителям, адсорбентам, носителям, неподвижным фазам, материалам дозатора, колонки, детектора и соединительных коммуникаций. Очень важным показателем является чистота газа-носителя. Баллонный технический газ с чистотой 99,9—99,99% обеспечивает устойчивую работу большинства газохроматографических детекторов. Однако для получения стабильных, линейных и высокочувствительных показаний некоторых типов детекторов требуются более чистые газы. Например, для ДЭЗ необходим азот особой чистоты (содержание примесей  $< 1 \text{ млн.}^{-1}$ ), а для гелиевого ионизационного детектора ( $\text{He}$  — ИД) необходим гелий со степенью очистки лучше, чем 99,999%. Работе почти всех детекторов, кроме пламенно-ионизационного детектора (ДПИ), мешают пары воды в газе-носителе. При работе с ДЭЗ необходима специальная очистка газа-носителя ( $\text{N}_2$ ) от примесей кислорода. Работе ДПИ мешают твердые частицы пыли, попадающие в пламя и нарушающие стабильность его горения.

Обычно в газовых хроматографах применяют пористые металлические фильтры для пыли; фильтры для осушки газа, запол-

Таблица II.12. Инертные газы, наиболее часто применяемые в газовой хроматографии

Газ	Характеристика	Типы детекторов	Теплопроводность	Теплоемкость	Требуемая чистота, %
Азот	Широкодоступный, дешевый	ДП, ДТП, ДПИ, ДЭЗ, ДПФ, ДТИ	Низкая	Высокая	99,99; 99,999 (ДЭЗ)
Аргон	Доступный, не очень дорогой	ДЭЗ, ДП, Аг — ИД	—»—	—»—	99,99
Водород	Доступный, дешевый	ДПИ, ДТИ, ДПФ	Высокая	Низкая	99,95...99,999 (электролитический)
Воздух	Широкодоступный, дешевый	ДТХ, ДПИ, ДТИ, ДФИ	Низкая	Высокая	Чистый, насколько возможно
Гелий	Редкий, дорогой	ДТП, Не — ИД	Высокая	Низкая	99,99; 99,999 (Не — ИД)
Диоксид углерода	Дешевый, доступный	ДП, ДПИ, объемные детекторы	Низкая	Высокая	99,9
Кислород	Дешевый, доступный	ДЭЗ, ДПФ	Низкая	—»—	99,9
Неон	Очень редкий, дорогой	Не — ИД	Средняя	Средняя	99,9

Примечание. ДТИ — термоионный; Аг — ИД — аргоновый ионизационный; ДТХ — термохимический; Не — ИД — неоновый ионизационный; ДФИ — фотоионизационный.



ненные силикагелем и (или) молекулярными ситами 5А; фильтры с катализаторами для очистки от кислорода; фильтры для очистки газа от органических примесей, заполненные силикагелем с большой удельной поверхностью или активным углем. Для очистки гелия применяют специальные диффузионные палладиевые фильтры. Для получения сверхчистого водорода применяют генераторы водорода. При анализе легко гидролизующихся и высокореакционных веществ требуется еще более тщательная очистка газаносителя.

Определенные газы-носители могут использоваться также в качестве вспомогательных газов с целью обеспечения работы некоторых типов детекторов: водород и воздух для ДПИ, кислород для пламенно-фотометрического детектора (ДПФ), добавки кислорода к газу-носителю для ДЭЗ, озон для хемилюминесцентного детектора (ДХЛ).

В табл. II.12 приведены некоторые характеристики и применяемость наиболее часто используемых в газовой хроматографии газов. Кроме перечисленных в табл. II.12 газов иногда для подавления сорбционной активности носителя в качестве газаносителя используют пары воды. В этом случае применяют специальные установки для стабильной подачи воды — генераторы пара и дифференциальный пламенно-ионизационный детектор (ДПИ), оптимизированный для работы с парами воды. Количество воды в резервуарах должно обеспечивать по крайней

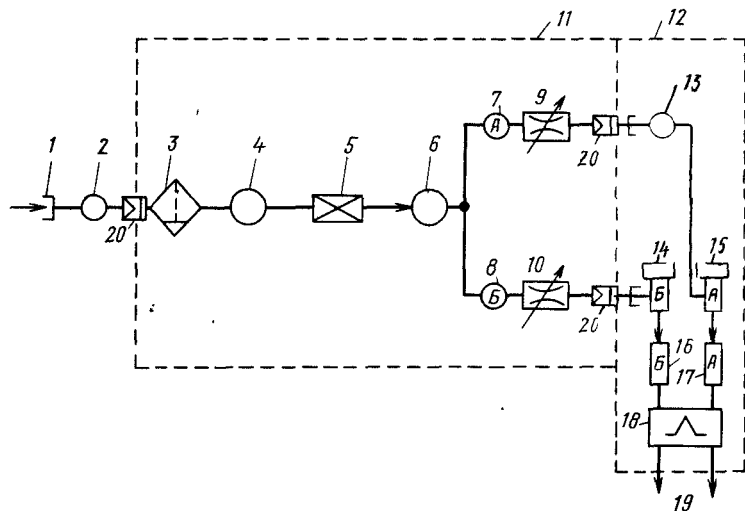


Рис. II.5. Пневматическая схема газового хроматографа «Агат» с ДТП:

1 — вход газаносителя, 2, 4, 6, 7, 8, 13 — трубопроводы, 3 — фильтр твердых частиц, 5 — регулятор расхода газа, 9, 10 — вентили, 11 — газовый блок, 12 — термостат колонок, 14, 15 — испарители, 16, 17 — колонки, 18 — детектор по теплопроводности, 19 — выходы газов, 20 — запорные клапаны

мере месячную ежедневную работу хроматографа. Применение паров воды достаточно подробно описано в научной литературе. Одним из примеров применения метода является улучшение симметрии пиков и эффективности разделения при анализе жирных кислот.

Пневматическая схема газового хроматографа в зависимости от количества и типов детекторов, наличия нескольких испарителей, колонок и дополнительных потоков газов может быть достаточно простой и сложной.

На рис. II 5 приведена наиболее простая схема газового хроматографа с одним детектором по теплопроводности (ДТП), двумя испарителями и двумя хроматографическими колонками — сравнительной и рабочей. Основными элементами блока подготовки газов газового хроматографа «Агат» (завод «Манометр», Москва) являются фильтр 3 твердых частиц на входе в хроматограф, двоянный регулятор расхода и давления 5 и вентили 9 и 10.

На рис. II 6 представлена более сложная схема газового

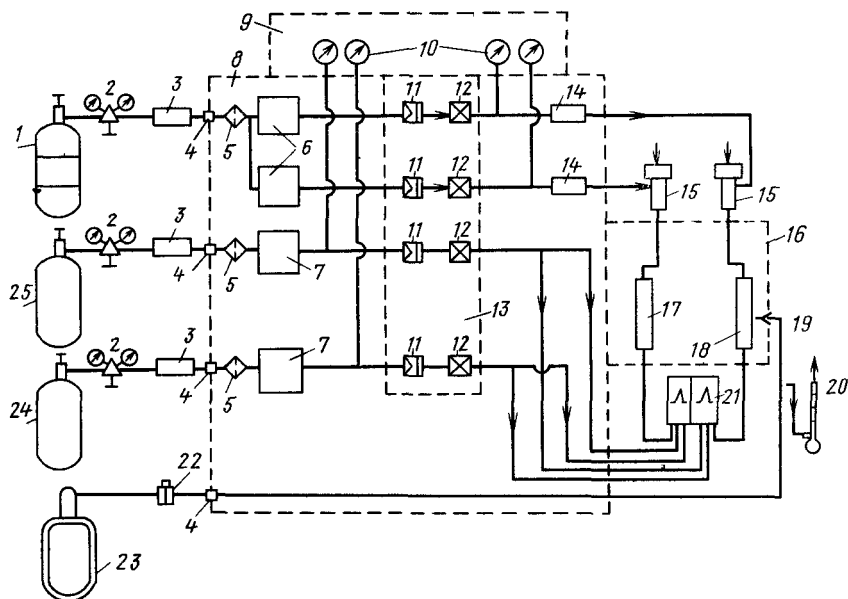


Рис. II 6 Пневматическая схема газового хроматографа модели 3700 с дифференциальным ДТП

1 — баллон с газом-носителем 2 — редукторы 3 — осушители 4 — газовые разъемы 5 — фильтры твердых частиц 6 — регуляторы давления и расхода 7 — регуляторы давления 8 — газовый блок хроматографа 9 — панель манометров 10 — манометры 11 — запорные клапаны 12 — вентили точной регулировки потока 13 — панель регуляторов 14 — дополнительные фильтры газа-носителя 15 — испарители 16 — термостат колонок 17, 18 — колонки 19 — тинная вставка жидкого азота 20 — пьезочувствительный измеритель расхода 21 — ДТП 22 — электромагнитный клапан 23 — сосуд Шюрера 24 — баллон с воздухом 25 — баллон с водородом

хроматографа модели 3700 (завод «Хроматограф») с дифференциальным ДПИ и криостатированием термостата колонок. Основными элементами блока подготовки газов хроматографа являются фильтры 5 твердых частиц на входе в хроматограф, сдвоенные регуляторы давления и расхода 6, регуляторы давления 7, манометры 10, запорные клапаны 11, вентили точной регулировки расхода газов 12 и дополнительные фильтры 14 для очистки газа-носителя от органических примесей и влаги. Блок подготовки газов или газовый блок имеет две панели: управления для ручного регулирования расхода газа 13 и измерения давления газов 9. На вход газового блока 8 от баллонов через редукторы 2 и осушители 3 подаются газ-носитель и вспомогательные газы. Газовые коммуникации блока с помощью разъемов соединяются с испарителями 15 и детекторами 21.

В связи с меньшими требованиями к стабильности и погрешности поддержания расхода вспомогательных газов на линиях этих газов, как правило, не применяют регуляторы расхода, а регуляторы давления выносят из газового блока и устанавливают на одной панели с осушителями 3.

При применении точных двухступенчатых баллонных редукторов и достаточно чистых вспомогательных газов последние подключаются непосредственно к лицевой панели регуляторов 13. Клапаны 11 устанавливают для отключения ненужных для конкретного анализа потоков газов, контроля герметичности системы, облегчения поджига пламени путем кратковременного закрывания клапана газа-носителя, для выключения подачи газов в конце рабочего дня без изменения давления на входе в хроматограф и газорегулирования вентилей точной регулировки 12. В этом случае при включении клапанов в начале работы на следующий день расход газов практически сохраняется и лишь иногда требуется небольшая корректировка входного давления.

Довольно высокие требования предъявляются к герметичности пневматической схемы газового хроматографа. Негерметичность газовых трактов оказывает влияние на стабильность нулевой линии (шумы и дрейф), на погрешность и воспроизводимость хроматографического анализа. Негерметичность линии газа-носителя после испарителя может привести к потерям пробы, а негерметичность линий вспомогательных газов к нестабильной работе детекторов. Кроме того, при негерметичности линий газа-носителя может происходить диффузия в колонку и детектор атмосферного кислорода, который способствует разложению пробы и неподвижной фазы, увеличивает фоновый ток и уменьшает чувствительность некоторых типов детекторов, разрушает чувствительные элементы детекторов по теплопроводности.

Герметичность линий хроматографа проверяют путем подсоединения образцового манометра к выходу линии и перекрытия газа на входе в хроматограф. Падение давления за 30 мин

не должно превышать 2% от установленного значения.

Давление на входе в газовый хроматограф обычно не превышает 1,0 МПа, а после регулятора давления составляет около 0,3 МПа. С целью сохранения этого перепада давлений постоянным не рекомендуется использовать баллоны со сжатыми газами до конца.

При криостатировании термостата колонок в случае применения в качестве хладагентов жидких азота или диоксида углерода к газовому блоку хроматографа подключают сосуд Дьюара 23 (см. рис. II.6) через регулируемый от электронного блока криотерморегулятора электромагнитный клапан 22.

Более высокие требования к стабильности поддержания расхода газа-носителя, особенно в условиях программирования температуры и расхода газа в колонке, вызывают необходимость применения, кроме игольчатых вентилей, точной регулировки потока, регуляторов расхода. Наиболее часто применяют мембранные регуляторы расхода газа, принцип действия которых основан на поддержании постоянного расхода с помощью мембраны, соединенной с регулирующим клапаном, и игольчатого дросселя. Мембрана поддерживает постоянный перепад давления на дросселе.

В современных газовых хроматографах регулятор расхода обычно конструктивно совмещается с регулятором давления в одном корпусе. Точность регулирования расхода с помощью мембранного регулятора составляет менее  $\pm 1\%$ .

При использовании автоматических регуляторов расхода в хроматографе устанавливают только регуляторы давления.

Иногда для анализа многокомпонентной смеси веществ, имеющих широкий интервал кипения и содержащих высококипящие, но недостаточно термостойкие соединения, такие как нормальные углеводороды  $C_{17}$  —  $C_{34}$ , полихлорированные бифенилы, полициклические ароматические соединения, в газовой хроматографии применяют метод программирования давления (расхода) газа-носителя. При низкотемпературном анализе термически неустойчивых соединений, таких как эфирные масла цитрусовых растений, эфиры жирных кислот, различные фармацевтические препараты и лекарства, метод программирования расхода газа-носителя по линейной программе заменяет неприемлемый в этих условиях метод программирования температуры.

Программирование давления газа-носителя на входе в колонку может осуществляться с помощью пневмоуправляемого редуктора или автоматического регулятора расхода по трем программам: линейной, экспоненциальной, тангенциально-гиперболической. Последнюю программу применяют главным образом для проведения ускоренного анализа представляющих интерес компонентов, выходящих из колонки впереди или позади основного компонента.

Типичные диапазоны программирования давления — от 0,015 до

1,0 МПа за время от 5 до 60 мин. Погрешность воспроизведения программы должна быть  $\pm 1,5\%$ .

Для обеспечения воспроизводимых параметров разделения в хроматографической колонке и оптимальных характеристик большинства типов детекторов необходима установка заданного расхода газа-носителя и поддержание его на заданном уровне с минимальной погрешностью. Кроме того, для точного определения удерживаемых объемов при физико-химических измерениях также необходимо значение расхода и давления газа-носителя.

В большинстве неавтоматизированных газовых хроматографов давление на входе в колонку измеряют образцовым манометром, а расход газа-носителя пенным измерителем расхода на выходе из детектора. В пенном измерителе расхода газа используют принцип замера времени прохождения мыльной пленкой определенного объема калиброванной бюретки. Время измеряют визуально с помощью секундомера при движении пленки снизу вверх. Расход газа рассчитывают по результатам измерений. Погрешность измерения составляет около 1%. С целью уменьшения погрешности измерения разработаны устройства, обеспечивающие автоматическую регистрацию и вычисление расходов газа с помощью оптических датчиков прохождения мыльной пленкой начала и конца отсчета калиброванного объема и электронного измерения времени. Погрешность измерения в этом случае менее 0,5%. Пенный измеритель расхода дает суммарный расход газа за время измерения, т. е. производит только периодические замеры расхода газа и не позволяет проводить непрерывное определение стабильности потока газа.

В некоторых простых или переносных газовых хроматографах для измерения расхода газа применяют ротаметры, которые могут быть использованы как на входе, так и на выходе колонки. Точность измерения расхода с помощью ротаметра невысокая; кроме того, требуется индивидуальная калибровка для каждого газа-носителя, температуры и давления. Ротаметры, например, применяют в портативных газовых хроматографах «Газохром 3101», предназначенных для экспресс-анализа состава топочных газов котлоагрегатов ( $H_2$ ,  $CH_4$ ,  $N_2$ ,  $O_2$ ,  $CO_2$ ).

Большое распространение получают электрические методы измерения давления и расхода газа-носителя. Давление, обычно измеряемое тензодатчиком, преобразуется в цифровую форму и регистрируется цифровым вольтметром (индикатором). В измерителе давления «Сапфир-22» (завод «Манометр», Москва) давление определяется тензодатчиком Д-16. Для электрического измерения расхода газа-носителя обычно используют датчики, действие которых основано на принципе действия термоанометра. Поточная и электрическая схемы измерения расхода газа с помощью такого датчика представлены на рис. II.7. Чувствительные элементы датчика, расположенные с обеих сторон от

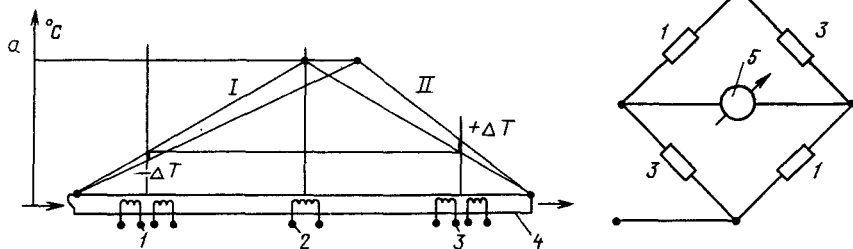


Рис. 11.7. Поточковая (а) и электрическая (б) схемы измерения расхода газа: 1, 3 — входной и выходной чувствительные элементы; 2 — спираль нагрева; 4 — трубка датчика; 5 — индикатор

нагревателя, включены в мостовую схему. В отсутствие потока газа мост сбалансирован, а распределение температур в трубке датчика соответствует профилю I. При включении газа вследствие переноса тепла от нагревателя по ходу потока газа температура входного чувствительного элемента 1 уменьшается на  $\Delta T$ , а выходного 3 увеличивается на  $\Delta T$ . Распределение температур станет соответствовать профилю II, а мостовая схема зафиксирует изменение сопротивлений резисторов, пропорциональное изменению температуры. Нормированный сигнал мостовой схемы измеряется на индикаторе 5 в виде расхода газа-носителя.

Выпускаемое серийно устройство измерения расхода газа ИРГ-110 (ОКБА, г. Дзержинск) предназначено для измерения в цифровой форме расходов гелия, азота и воздуха в газовых линиях хроматографа в интервале от 0 до 100 см<sup>3</sup>/мин. Так как ИРГ-110 имеет выход на регистратор, то с его помощью можно определять стабильность расхода газа на регистраторе со шкалой 1 мВ.

Блок-схема функциональных узлов устройства представлена на рис. 11.8. Газ, проходя по трубке датчика, отбирает часть тепла от чувствительного элемента 1 и передает его чувствительному элементу 2. Стабилизаторы температуры 3 изменяют напряжение чувствительных элементов пропорционально расходу газа, протекающего через датчик. Разность напряжений усиливается усилителем 4 и через переключатель выбора применяемого газа 6 поступает на преобразователь «напряжение — частота» 7 или на регистратор 17. Электронные блоки 8—13 вычисляют расход газа-носителя и передают информацию на блок индикаторов 15.

Общие требования к электрическим измерителям расхода следующие: интервал измерения He, H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> от 0 до 100 см<sup>3</sup>/мин; погрешность измерения менее 1%; интервал измерения воздуха от 100 до 500 см<sup>3</sup>/мин; погрешность измерения менее 5%; постоянная времени менее 5 с.

Рис. II.8 Блок-схема измерителя расхода газа ИРГ-110:

1, 2 — входной и выходной чувствительные элементы, 3 — стабилизаторы температуры, 4 — усилитель, 5 — индикаторы, 6 — переключатель выбора газа и резисторы калибровки, 7 — преобразователь «напряжение — частота», 8 — кварцевый генератор, 9 — делитель, 10 — распределитель импульсов, 11 — счетчик, 12 — блок памяти, 13 — блок управления, 14 — дешифратор, 15 — блок индикаторов, 16 — блок стабилизатора температуры, 17 — выход на регистратор, 18 — датчик, 19 — трубка

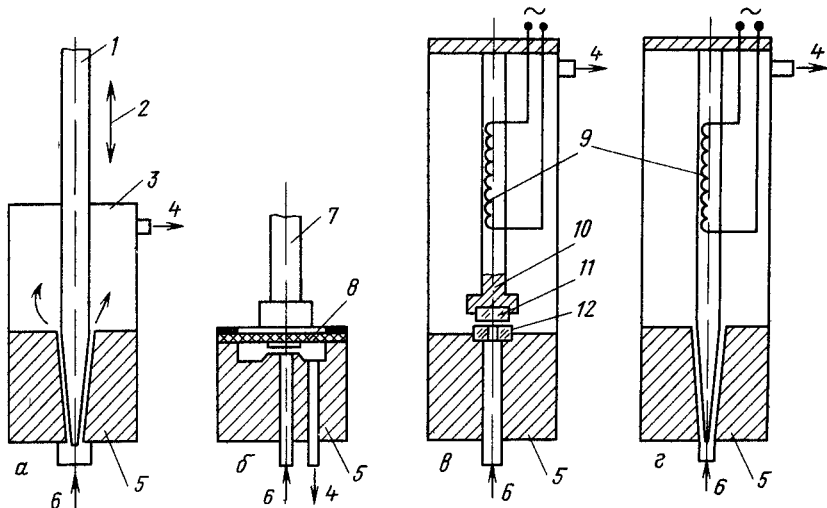
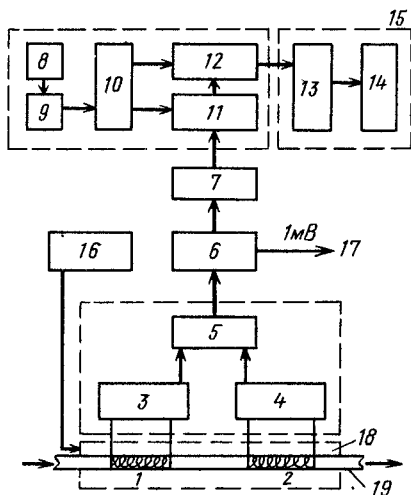


Рис. II.9. Электромеханический (а), электромагнитный (б), тепловой с диафрагмой (в), тепловой с иглой (г) исполнительные механизмы автоматических регуляторов расхода газа:

1 — регулирующая игла, 2 — направления иглы, 3 — корпус регулятора, 4 — выход газа, 5 — основная регулятора, 6 — подвод газа, 7 — якорь электромагнита, 8 — мембрана, 9 — нагреватель, 10 — шток, 11 — плоский часовой камень, 12 — камень с отверстием

Электрическое регулирование расхода газа-носителя можно осуществлять различными способами. Наиболее распространенные из них представлены на рис. II.9. Электромеханическое регулирование (рис. II.9, а) осуществляется с помощью игольчатого вентиля 1 и электродвигателя, в качестве которого перспективно применение управляемого микропроцессором шагового двигателя.

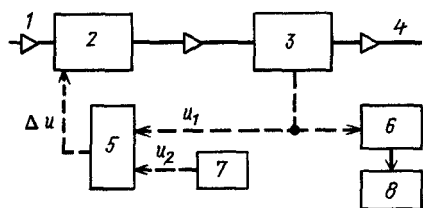


Рис. II 10 Блок-схема установки задания и регулирования расхода газа-носителя:

1 — вход газа-носителя, 2 — регулятор расхода, 3 — датчик измерителя расхода, 4 — выход газа-носителя, 5 — блок регулирования, 6 — измеритель расхода, 7 — задатчик расхода, 8 — блок индикации

Электромагнитное регулирование осуществляется с помощью электромагнитного вентиля или мембраны 8, открывающейся и закрывающейся с заданной частотой, пропорциональной расходу газа-носителя (рис. II.9, б). Тепловой метод регулирования основан на удлинении нагреваемого стабилизированным электрическим током медного стержня с игольчатым вентилем 1 на его незакрепленном конце (рис. II.9, з) или парой плоских часовых камней 11 и 12 (рис. II.9, в). Удлинение стержня пропорционально его температуре или подаваемому на нагреватель стержня 9 напряжению, пропорциональному в свою очередь расходу газа-носителя. Могут быть применены также сочетания перечисленных выше способов.

Блок-схема установки задания и регулирования расхода газа-носителя представлена на рис. II.10. Поток газа проходит через электрический регулятор 2 и измеритель 3 расхода. Расход на измерителе в цифровой форме преобразуется в напряжение  $U_1$  и одновременно регистрируется с помощью блока измерения 6. От задатчика расхода 7 на электронный блок регулирования расхода 5 подается напряжение  $U_2$ . Разность напряжений  $\Delta U$  используют для регулирования расхода газа-носителя до тех пор, пока  $U_1$  и  $U_2$  не станут равными. Дискретность задания расхода обычно составляет  $1 \text{ см}^3/\text{мин}$ . Для качественного регулирования расхода газа постоянная времени системы, состоящая из постоянных времени измерителя и регулятора, не должна быть больше 5 с.

Фирма «Perkin — Elmer» (США) выпускает цифровой измеритель и регулятор расхода газа-носителя, предназначенный для использования со следующими газами: гелием, азотом и смесью  $\text{Ag} - \text{CH}_4$  в соотношении 95:5. Газ-носитель, протекая через датчик, создает градиент температур  $\Delta T$  между чувствительными элементами, прямо пропорциональный расходу потока.  $\Delta T$  преобразуется в разность потенциалов, которая усиливается и прикладывается к электромагнитному вентилю, регулирующему расход газа. Максимальное давление на входе в устройство — не более 1,0 МПа, диапазон измеряемых расходов — от 5 до  $99 \text{ см}^3/\text{мин}$ , постоянная времени — 5 с, погрешность —  $(\pm 2\%)$ .

Регуляторы расхода РРГ-10 хроматографа «Кристалл-2000» (ОКБА, г. Йошкар-Ола) рассчитаны на работу с газами  $\text{N}_2$ ,  $\text{He}$ ,  $\text{H}_2$  и воздух. Регулятор расхода РРГ-10 состоит из преоб-



разователя (измерителя) расхода газа, масштабного дифференциального усилителя регулятора и клапана, расположенных в одном корпусе, имеющем входной и выходной штуцеры газа. Преобразователь, с помощью усилителя преобразующий расход газа в напряжение с коэффициентом преобразования  $10 \text{ мВ/см}^3 \cdot \text{мин}$ , выполнен в виде двух последовательно включенных теплообменников, температура в которых поддерживается на  $50^\circ \text{C}$  выше температуры поступающего газа с помощью элементов усилителя. Разность мощностей, необходимых для поддержания равновесного режима в теплообменниках при переносе тепла от первого по потоку ко второму, пропорциональна расходу газа при условии полного прогрева пара в теплообменниках. Последнее условие выполняется при расходах до  $200 \text{ см}^3/\text{мин}$ , при этом погрешность преобразования не превышает  $1\%$ . При больших значениях расхода газа погрешность преобразования увеличивается до  $10\%$ . Входной штуцер преобразователя расхода подключен к клапану, регулирующий элемент которого выполнен на часовых камнях с электромагнитным приводом. Максимальное давление на входе  $0,4 \text{ МПа}$ , интервал измерения  $\text{N}_2$  и  $\text{H}_2$   $1,0\text{—}100 \text{ см}^3/\text{мин}$  и воздуха  $10\text{—}700 \text{ см}^3/\text{мин}$ , постоянная времени менее  $2 \text{ с}$ . Регулятор РРГ-10 позволяет сравнительно просто осуществить программирование расхода газа-носителя по любому закону и по программе, заложенной в памяти микропроцессора или мини-ЭВМ.

Рассмотренные способы электрического измерения расхода и давления, регулирования расхода газа, наряду с отдельным и совместным автоматическим программированием температуры колонки и расхода (давления) газа-носителя на входе в колонку, являются необходимыми этапами на пути к полной автоматизации работы газового хроматографа.

### *Глава 3*

## **ВВОД ПРОБЫ**

Процесс ввода пробы во многом определяет конечный результат всего хроматографического анализа в целом. Несмотря на это в общей последовательности стадий хроматографического анализа (подготовка пробы — дозирование — разделение — детектирование — обработка данных), вводу пробы уделяется незаслуженно мало внимания. Не случайно системы ввода пробы как бы в противовес известным аналогиям (колонка — сердце хроматографа, детектор — его мозг) называют ахиллесовой пятой хроматографа.

Любая система ввода пробы должна удовлетворять трем общим требованиям: 1) вносить минимальный вклад в размывание хроматографических пиков; 2) обеспечивать максимальную точ-

ность и воспроизводимость дозируемого в разделительную колонку количества образца; 3) сохранять неизменность количественного и качественного состава смеси до и после дозирования.

Размер вводимого в колонку образца в зависимости от решаемых задач в хроматографии может меняться на много порядков: от нанограммовых количеств для капиллярных колонок до килограммовых для препаративных колонок, и каждая система ввода рассчитана на вполне определенный интервал объемов дозы. Размывание пробы в системе ввода (один из факторов внеколоночного размывания пиков) зависит от конструкции дозатора и условий его эксплуатации. Минимальный мертвый объем, хорошо сформированный поток подвижной фазы, быстро направляющий весь образец непосредственно в колонку, точное поддержание заданных температурных режимов — вот основные характеристики системы ввода, вносящей минимальный вклад в размывание пиков.

Необходимость дозирования образца с высокой точностью и воспроизводимостью связана с тем, что хроматография как аналитический метод является методом относительным, основанным на сравнении параметров изучаемого объекта с известными параметрами эталонного объекта. При количественных измерениях с абсолютной градуировкой погрешность градуировки непосредственно определяется погрешностью дозирования. При физико-химических применениях хроматографии количество дозируемой пробы учитывается во многих расчетах и также должно определяться с высокой точностью. Эти требования, как правило, усугубляются необходимостью ввода очень малых объемов пробы, составляющих, например, для капиллярных колонок до  $10^{-3}$  мкл жидкости.

Третье общее требование, предъявляемое к системе ввода, состоит в том, чтобы в ней не происходило количественного и качественного изменения состава образца. Фракционирование компонентов в газовой хроматографии может происходить при недостаточно высокой температуре зоны испарения образца. При детальном изучении различных вариантов ввода разбавленных растворов компонентов с широким диапазоном летучестей (например, углеводородов  $C_{10}$  —  $C_{36}$ ) в капиллярные колонки был обнаружен обратный эффект: если температура иглы шприца превышает температуру кипения растворителя, то чем тяжелее компонент, тем больше полнота его перевода в колонку отличается от 100% [27, 28]. Для устранения «эффекта дискриминации» более тяжелых компонентов из-за фракционирования в игле шприца разработаны системы ввода с вторичным охлаждением, реализующие способ ввода с помощью холодной иглы.

Качественный состав пробы может меняться из-за разложения термолабильных соединений при контакте с нагретым металлом стенок испарителя, каталитических превращений или селективной

сорбции на поверхности металла, а также на обуглившихся нелетучих остатках предыдущих проб или кусочках прокальваемой иглой шприца самоуплотняющейся мембраны. В этих случаях используют стеклянные вкладыши в металлический инжектор или технику ввода пробы непосредственно в колонку. Во всех случаях должна быть предусмотрена возможность периодической чистки системы ввода.

Наряду с перечисленными общими требованиями, распространяющимися на любые системы ввода пробы, имеются специфические требования, зависящие от типа и назначения каждой индивидуальной системы.

Различают дозаторы в зависимости от варианта хроматографии (газовая, жидкостная, тонкослойная), агрегатного состояния вводимой пробы (газообразное, жидкое, твердое), а также от ее количества (аналитические насадочные или капиллярные колонки, препаративные колонны). Рассмотрим характерные особенности каждой из разновидностей систем ввода.

### **3.1. ТЕХНИКА ВВОДА ГАЗООБРАЗНЫХ ПРОБ**

Распространены два метода дозирования образцов, находящихся при условиях ввода в газообразном состоянии: с помощью шприца и дозирующего крана. Газовый образец заполняет определенный объем и вводится в прибор в первом случае при прокалывании иглой шприца самоуплотняющейся силиконовой мембраны, а во втором — при переключении потоков в газовой схеме. Дозирующие шприцы, состоящие, как известно, из калиброванного цилиндра, поршня и иглы, имеют вместимость от 0,01 до 100 мл и обеспечивают воспроизводимость дозирования в зависимости от опыта оператора от 1 до 5%. Шприц — более гибкий и простой инструмент, чем кран, однако дозирующий кран дает большую воспроизводимость (до 0,5% объема калиброванной петли), пригоден для автоматического отбора проб из постоянных потоков в условиях как лаборатории, так и промышленного производства, для работы не требуется высокая квалификация оператора.

При вводе газовых проб с помощью переключающихся кранов образец становится частью объема газа-носителя и вместе с потоком последнего поступает в колонку. При этом давление в системе должно быть хорошо сбалансировано, чтобы при переключении крана бросок давления был бы минимальным. В случае прецизионных измерений давление в петле дозатора необходимо контролировать и с помощью дросселя выравнять с давлением на входе в колонку. Наибольшее распространение получили вращающиеся шестиходовые краны из нержавеющей стали и фторопласта. Схема такого крана дана на рис. II.11. В одной позиции (рис. II.11, а) калиброванный объем  $V$  заполняется анализируемой

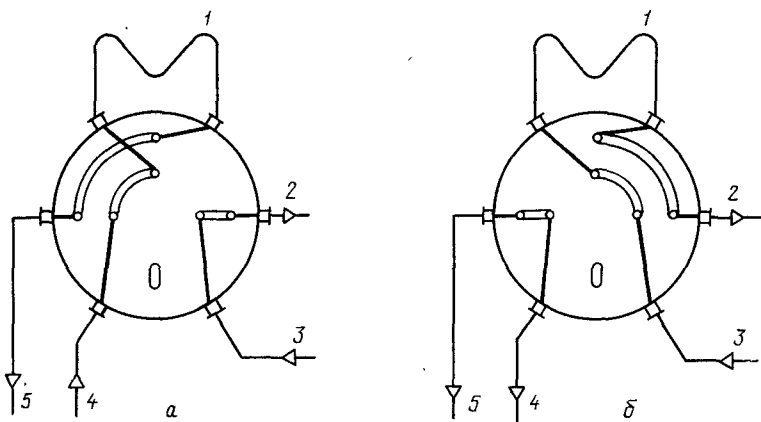


Рис. II.11. Схема дозирующего газового крана:

*а* — заполнение калиброванного объема анализируемой пробой, *б* — стадия анализа, 1 — калиброванный объем, 2 — к колонке, 3 — подача газа-носителя, 4 — подача пробы, 5 — сброс пробы

пробой при известном давлении; при повороте крана (рис. II.11, б) проба поступает в колонку.

С разработкой и применением новых полимерных материалов, сходных по свойствам с фторопластом, но обладающих меньшей текучестью, надежность работы кранов, особенно при повышенных температурах, увеличивается. Еще более высоким температурным пределом использования обладают целиком металлические без деталей из полимерных материалов краны. Однако технические трудности их изготовления и эксплуатации, связанные с обеспечением герметичности контактирующих вращающихся металлических поверхностей, ограничивают их применение.

Используют также цилиндрические краны с поршнем, совершающим возвратно-поступательные перемещения. Поршень имеет несколько кольцевых герметизирующих прокладок, разделяющих цилиндр на несколько (от 4 до 8) секций. Его устанавливают в две стандартные позиции: 1) заполнения калиброванного объема пробой; 2) подачи пробы в колонку. Главные недостатки этой конструкции крана — эффект «памяти» кольцевыми прокладками предыдущих проб и более высокие по сравнению с кранами вращающегося типа мертвые объемы.

### 3.2. ТЕХНИКА ВВОДА ЖИДКИХ ПРОБ

Ввод жидких проб шприцем через самоуплотняющуюся резиновую мембрану в непрерывно движущийся поток газа-носителя получил широкое распространение и реализуется практически во всех выпускаемых хроматографах. Наряду с большими достоинствами этого способа ввода, главным из которых является простота

конструкционного оформления, он обладает и недостатками. Последние привели к появлению разработок по безмембранным системам ввода, которые в будущем должны составить конкуренцию мембранным системам.

**Микрошприцы.** Характеристики шприца и правильное его использование во многом определяют точность и воспроизводимость работы всей системы ввода. Получившая распространение конструкция микрошприца состоит из стеклянного цилиндрического корпуса с нанесенной на него линейной шкалой с калиброванным внутренним каналом, металлического поршня и иглы, съемной или зафиксированной постоянно. Шприцы для малых дозировок имеют рабочий объем, заключенный лишь в игле; поршень — проволока диаметром около 0,2 мм — доходит до самого конца иглы, благодаря чему мертвый объем отсутствует.

Отечественная промышленность выпускает микрошприцы марок МШ-1 и МШ-10 с интервалом дозирования жидкости 0,1—1,0 и 0,2—10,0 мкл соответственно, а также микрошприц «Газохром 101» для дозирования жидких проб объемом до 1 мкл с относительным средним квадратическим отклонением случайной составляющей погрешности не более 2%.

Микрошприцем проба через самоуплотняющуюся мембрану вводится либо в испаритель хроматографа, либо непосредственно в колонку. Выбор способа дозирования зависит от природы образца, решаемых аналитических задач, типа и режима работы колонок.

**Испарители.** В устанавливаемом перед разделительной колонкой испарителе вводимая жидкая проба должна мгновенно испариться и в смеси с газом-носителем в виде узкой полосы поступить в колонку. В процессе испарения происходит резкое увеличение на 2—3 порядка объема исходной жидкой пробы. В результате давление в испарителе возрастает, и пары образца распространяются как по направлению к колонке, так и, если не принять специальных мер, по подводящим газ-носитель коммуникациям. Здесь часть пробы может сконденсироваться и затем, медленно испаряясь в поток газа-носителя, вызовет значительное размывание заднего фронта пика. Кроме того, важно свести к минимуму попадание паров образца в относительно холодную зону возле силиконовой мембраны, на которой также может произойти конденсация. Аналогичный эффект вызовет наличие в испарителе непродуваемых газом-носителем объемов, куда проба попадает при повышении давления в момент ее испарения, а затем медленно диффундирует.

Для мгновенного испарения необходимо обеспечить быструю передачу к образцу больших количеств тепла. Источником тепла может служить газ-носитель или материал испарителя. Поскольку теплоемкость газа-носителя очень низкая, тепло к пробе поступает в основном от непосредственно контактирующего с пробой ма-

териала испарителя. Используемые конструкционные материалы (стекло, нержавеющая сталь) обладают низкой теплопроводностью, поэтому для обеспечения количества тепла, достаточного для перевода смеси из жидкого состояния в пар, испаритель либо должен быть разогрет до очень высокой температуры, либо иметь развитую поверхность контакта с пробой. Так как высокие температуры вызывают разложение термолабильных соединений, для решения проблемы используют второй путь, который нашел практическую реализацию в большом числе так называемых линейных конструкций испарителей.

Для предотвращения обратной диффузии паров пробы в линию газа-носителя патрубков ввода газа в испаритель располагают не в верхней части в непосредственной близости от мембраны, а в средней части цилиндрического корпуса. Газ-носитель в этом случае проходит через узкий концентрический зазор между корпусом испарителя и внутренним вкладышем (или верхней частью колонки). Это приводит к двум положительным следствиям: 1) температура газа-носителя повышается, и он проходит в зону испарения образца в нагретом состоянии; 2) обратная диффузия образца через узкий концентрический зазор затруднена, и эффекты «памяти» испарителя минимизируются.

Уже упоминалось, что в некоторых случаях компоненты образца разлагаются в системе ввода. Разложение может происходить не только при контакте с разогретым металлом испарителя, но также из-за вторичных эффектов. Последние связаны с наличием на внутренней поверхности инжекционного блока перегретых участков либо с каталитическим действием твердых обуглившихся частиц, отложившихся на стенках испарителя. Твердые частицы могут аккумулялироваться в зоне испарения в результате разных причин. Природные образцы часто содержат во взвешенном состоянии следы нелетучих веществ или высококипящие примеси, не испаряющиеся при температуре испарителя. В некоторых методиках анализа предусмотрено испарение лишь части введенной жидкой пробы, как, например, при определении содержания растворенных газов в биологических жидкостях. Наконец, при прокалывании иглой шприца мембрана выкрашивается, и кусочки силиконовой резины также собираются в горячей зоне испарителя. Все это указывает на то, что при конструировании систем ввода необходимо предусмотреть возможность их периодической чистки. Эта операция облегчается при использовании в стальных испарителях стеклянного вкладыша, который также исключает контакт испаряющегося образца с разогретой поверхностью металла.

Самым слабым звеном в конструкциях испарителей является мембрана. Первая проблема, связанная с этой прокладкой из органических полимерных материалов, состоит в ее механической прочности, которая определяет число проникновений через мем-

брану иглы шприца до момента нарушения герметичности системы. Практика показала, что чем меньше по площади зона, в которую попадает игла шприца при повторных вводах, тем больше время «жизни» мембраны. Поэтому прижимающие мембрану накладные гайки в последних конструкциях приборов имеют диаметр отверстия не 3—4 мм, как раньше, а менее 2 мм. Кроме того, с целью продления срока эксплуатации мембран стали применять направляющие устройства для иглы шприца.

Вторая проблема состоит в эффекте «памяти», связанном с сорбцией мембраной растворителя и компонентов пробы. Силиконовые эластомеры, из которых обычно изготавливают мембраны, способны, например, при 25 °С сорбировать равное им по массе количество бензола или вдвое превышающее их массу количество тетрахлорида углерода. Эффект «памяти» особенно сильно проявляется при работе в режиме программирования температуры.

Близка к нему и третья проблема, связанная с явлением уноса из материала мембраны продуктов термодеструкции, а также летучих олигомеров или мономеров, используемых при производстве синтетических эластомеров. Простейшее профилактическое средство — частая замена мембран и их термическое кондиционирование вне испарителя, например в термостате колонок хроматографа.

Имеется несколько более радикальных способов полного или частичного решения указанных проблем, а именно: механическая защита мембраны; бислойные мембраны; охлаждение мембраны; системы с продувочным потоком; безмембранные системы ввода.

Несколько снизить отрицательные последствия связанных с мембраной явлений сорбции и уноса позволяет поворотное устройство, смонтированное на головке испарителя, с помощью которого сразу после извлечения из испарителя иглы шприца и до момента следующего дозирования либо удаляют мембрану из зоны контакта с газом-носителем, либо защищают нижнюю поверхность мембраны термостойким экраном (металл, асбест и др.).

Известно техническое решение, в котором предусмотрено наличие защитной тонкой ленты из фторопласта, установленной в головке испарителя между мембраной и горячей зоной. После каждого прокола иглой шприца мембраны и ленты последняя смещается с целью вывода места прокола из горячей зоны. Аналогичный эффект оказывает использование бислойных мембран, состоящих из верхнего толстого эластичного слоя силиконового эластомера и нижнего тонкого неэластичного слоя термостойкого полимера.

Чем ниже температура мембраны, тем меньше продуктов деструкции или низкомолекулярных остатков попадает из нее в газ-носитель. С другой стороны, при низких температурах возрастает сорбционная способность мембраны и вероятность кон-

денсации на ней высококипящих компонентов пробы. Общее правило состоит в том, чтобы различие между температурой кипения самого тяжелого компонента пробы и температурой обращенной в испаритель поверхностью мембраны не превышало 50 °С. На практике для охлаждения мембраны прижимающую ее накидную гайку изготавливают с глубоко прорезанными ребрами.

Более эффективный подход к решению проблем сорбции и уноса состоит в том, чтобы газ, контактирующий с мембраной, не попадал в хроматографическую колонку, а сбрасывался. При этом часть пробы не должна сбрасываться с этим газом.

Использование безмембранных систем ввода — самый радикальный способ устранения всех проблем, связанных с мембраной. С появлением таких систем была нарушена длившаяся 30 лет монополия мембранных систем ввода. Уже получили распространение безмембранные системы ввода пробы в капиллярные колонки, в которых игла шприца вводится в инжектор через двухпозиционный клапан, обеспечивающий полную герметичность системы на всех стадиях дозирования [29]. Недостатком таких систем пока является сложность конструкции и высокая стоимость. Имеются и более простые конструкции, в которых отсутствуют движущиеся притертые металлические поверхности [30].

Таким образом, высокоэффективный испаритель должен отвечать следующим основным требованиям: 1) равномерный обогрев инжекционного блока в интервале температур 50—500 °С с дискретностью установки температуры 5—10 °С и точностью регулирования  $\pm (1—5)$  °С; 2) развитая поверхность, обеспечивающая подвод достаточного для мгновенного испарения пробы количества тепла; 3) минимальный объем зоны испарения, отсутствие непродуваемых газом-носителем зон; 4) поток газа-носителя должен быть сформирован таким образом, чтобы обратная диффузия образца в холодную зону возле мембраны и в подводящие линии была сведена к минимуму; 5) газ-носитель должен приходить в зону испарения образца в нагретом до температуры испарителя состоянии; 6) внутренняя поверхность испарителя должна быть легко доступна для периодической очистки; 7) эффект «памяти» мембраны должен быть минимизирован, сама мембрана должна иметь более низкую температуру, чем корпус испарителя, либо должна использоваться безмембранная система ввода.

**Ввод пробы непосредственно в колонку.** Для реализации этого способа ввода обычно используют стандартные испарители, в которых предусмотрена возможность замены внутреннего вкладыша начальным участком стеклянной колонки. Конец колонки вводят во внутреннюю камеру испарителя вплоть до мембраны. Проба из иглы шприца попадает в начало колонки, где температура под-



держивается на более высоком уровне, чем в ее остальной части. Здесь образец испаряется и постоянным потоком газаносителя немедленно переносится в заполненную насадкой часть колонки. Следует обращать внимание на то, чтобы перегреваемый участок колонки во избежание усиления уноса неподвижной жидкой фазы не заполнялся сорбентом. Температура обогреваемой зоны не должна превышать верхний температурный предел используемой неподвижной фазы.

### 3.3. ТЕХНИКА ВВОДА ТВЕРДЫХ ПРОБ

Обычно твердый образец растворяют в подходящем растворителе и полученный раствор вводят в колонку, используя технику ввода жидких проб. Растворитель не должен вступать в реакции с целевыми компонентами анализируемой пробы или с сорбентом, не должен селективно экстрагировать отдельные компоненты из твердого образца (если намеренно не используется техника селективной экстракции). Кроме того, на хроматограмме пик растворителя не должен перекрывать пики анализируемых соединений. Существенный недостаток такого способа дозирования — ввод в колонку больших объемов растворителя, что приводит к возможности смыва с начального участка колонки неподвижной фазы и наличию на хроматограмме растянутого «хвоста» пика растворителя.

Кроме того, при вводе иглы шприца с раствором в горячую зону испарителя еще до момента начала подачи поршня растворитель начинает интенсивно испаряться из иглы. Остающаяся в игле шприца жидкость обогащается тяжелыми компонентами, причем чем менее летуч компонент, тем больше его по отношению к менее летучим компонентам остается в игле. В результате при количественном анализе обнаруживается «дискриминация» по тяжелым компонентам, т. е. экспериментально определяемая концентрация тяжелых компонентов в пробе оказывается заниженной, а более легких — завышенной, по сравнению с их истинной концентрацией.

Указанные недостатки устранены в способах дозирования, в которых раствором твердого образца смачивают носитель (отрезки стеклянного капилляра, кусочки сетки или спирали из платины или нержавеющей стали), легколетучий растворитель удаляют при испарении вне хроматографа и носитель вместе с нелетучим при комнатной температуре образцом через шлюзовой ввод переносят в горячую зону испарителя, где образец испаряется и вместе с потоком газаносителя поступает в колонку. Такой подход неприемлем при анализе твердых образцов, содержащих относительно легкие компоненты, часть которых может быть потеряна за счет испарения вместе с растворителем. В этих случаях образец помещают в микрокапсулы из стекла, мягкого или легко-

плавкого металла. Капсулу с образцом переносят в испаритель хроматографа, где она в потоке газа-носителя тем или иным способом вскрывается; проба испаряется и в виде паров поступает в колонку. Недостатком рассмотренных способов дозирования является сложность конструкции шлюзового ввода, обусловленная наличием большого числа подвижных трущихся элементов.

Представляет интерес способ ввода твердых проб с помощью специального шприца. Измельченный в тонкий порошок образец помещают на выходящий из иглы «язычок», которым заканчивается поршень. Затем поднятием поршня «язычок» вместе с пробой вытягивают в иглу шприца и осуществляют обычные операции — прокол мембраны, ввод иглы в горячую зону испарителя и подачу поршня. Образец либо выталкивается в испаритель из иглы, либо испаряется с язычка.

### 3.4. ТЕХНИКА ВВОДА ПРОБЫ В КАПИЛЛЯРНЫЕ КОЛОНКИ

В зависимости от рабочих характеристик капиллярных колонок и уровня концентраций анализируемых компонентов в пробе последнюю вводят в колонку одним из трех способов: с делением потока, без деления потока (в виде пара), непосредственно в колонку (в виде жидкости).

**Системы ввода с делением потока.** Проба в количестве, удобном для ввода обычным способом (0,1—1,0 мкл), подается в систему, полностью испаряется, и гомогенная смесь паров пробы с газом-носителем разделяется на два неравных потока: меньший поступает в колонку, а больший — сбрасывается. Если гомогенизация полная, то образец будет делиться в отношении, определяемом скоростями двух указанных потоков. Соотношение этих потоков называют отношением деления. На практике используют делители с отношением деления от 1:10 до 1:1000. Конструкция делителя должна обеспечивать в процессе ввода строгое постоянство отношения деления. На него оказывают влияние следующие факторы: изменение давления при испарении пробы, зависимость вязкости парогазовой смеси от ее состава, конденсация растворителя на входе в капиллярную колонку.

Помимо поддержания постоянного соотношения потоков, делитель должен разделять все компоненты смеси в одной и той же пропорции; только в этом случае он может быть назван линейным. Известны три основных условия линейности делительного устройства: 1) относительные размеры пиков должны быть идентичны или расчетным значениям, или относительной площади пиков, найденной без деления на том же самом детекторе; 2) при анализе смесей различной концентрации площади пиков должны быть пропорциональны концентрациям компонентов; 3) относительные размеры пиков на хроматограмме должны оставаться постоянными при изменении условий проведения анализа, таких

как температура, скорость потоков, отношение деления и т. д. Другими словами, эти условия означают, что никакого фракционирования компонентов образца не происходит в самом делителе, что относительные размеры пиков могут быть только функцией концентрации и, наконец, что изменения в аналитических параметрах не приводят к фракционированию.

Существуют причины, по которым даже линейный делитель дает искаженные результаты. Так, селективное испарение молекул различного размера из иглы микрошприца может привести к дискриминации компонентов. Если в процессе испарения образуется аэрозоль или проба испаряется неполностью, фракционирование происходит также до делителя. К аналогичному эффекту приводит селективная адсорбция отдельных компонентов смеси на активных участках поверхности системы ввода или адсорбция тяжелых веществ на холодных частях газовых коммуникаций. С другой стороны, если температура испарителя слишком высока, некоторые компоненты могут разлагаться. Наконец, если пары образца не будут полностью смешаны с газом-носителем, неомогенная смесь подойдет к точке деления. Во всех этих случаях хроматограмма не будет соответствовать исходному составу образца, хотя деление само по себе может быть и линейно. Кроме того, в некоторых случаях первые пики выходят из капиллярной колонки настолько острыми, что скорость пробега каретки регистрирующего устройства не обеспечивает их верную запись. Поэтому относительные площади первых пиков могут быть занижены не за счет делителя, а из-за инерционности регистрирующей системы. Аналогичная ошибка может возникнуть при обсчете площадей пиков несовершенным интегратором.

Простейшие схемы устройства различных делителей представлены на рис. II.12. Пропорциональность деления потоков достигается использованием в линии сброса пневматического сопротивления, функции которого может выполнять длинная капиллярная трубка, игла с небольшим отверстием или регулируемый вентиль. Весь блок делителя, включая сопротивление линии сброса, должен находиться при температуре, исключающей возможность конденсации компонентов образца. В качестве конструкционного материала при изготовлении делителей потока чаще используют стекло вместо металла.

Техника ввода пробы с делением потока хорошо отработана и получила широкое распространение. Однако она имеет два принципиальных недостатка: концентрации анализируемых компонентов в пробе должны быть выше определенного предела ( $> 10 \text{ млн.}^{-1}$ ), так как при большем разбавлении для их определения не хватит чувствительности детектирующей системы; стадия перевода образца в горячем испарителе в парообразное состояние исключает работу с термолабильными соединениями. Первый недостаток исключен при вводе пробы без деления потока.

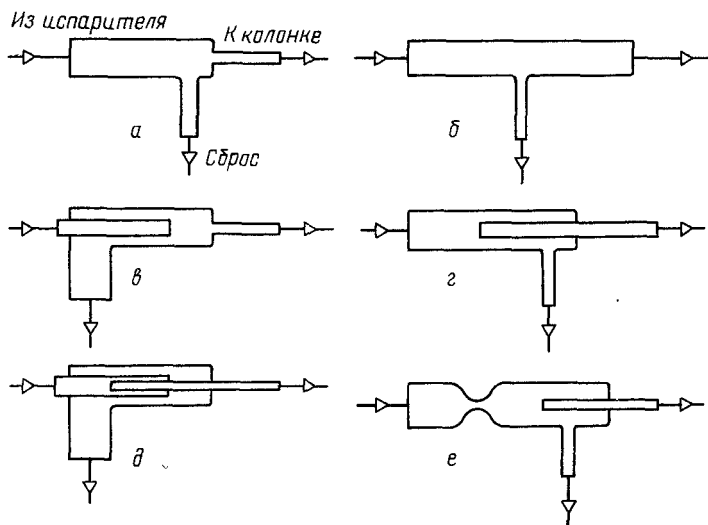


Рис. П.12. Схемы делителей потока для систем ввода пробы в капиллярные колонки:

а, б — тройники, в — байпасный тройник; г — концентрическая трубка, д, е — модифицированные концентрические трубки

**Системы ввода без деления потока.** Способ ввода пробы, при котором весь образец целиком попадает в капиллярную колонку, был предложен в 1969 г. К. Гробом и Г. Гробом [31]. Системы такого типа нашли применение в анализе сильно разбавленных жидких образцов при исследовании загрязнения органическими веществами окружающей среды, изучении состава природных продуктов, в биомедицине. Сущность способа состоит в том, что относительно большое количество (1—5 мкл) разбавленного образца вводится в испаритель, испаряется и в виде пара переводится в колонку. Для исключения перегрузки колонки количество растворенных анализируемых компонентов в пробе не должно превышать 50 нг.

В отличие от системы с делением потока, где проба при испарении должна гомогенно смешаться с газом-носителем, в данном варианте обеспечивают минимальное смешение паров пробы с газом-носителем и их подачу в колонку в виде не разбавленной газом полосы. Большой избыток летучего растворителя дает растянутый «хвост», который мешает определению ближайших к пику растворителя компонентов, поэтому инжектор через 30—60 с после ввода образца подключается к системе форсированной продувки. Анализируемые компоненты к этому моменту практически уже на 100% переводятся в колонку, а остатки паров растворителя от нее отсекаются.

Главным моментом в технике ввода без деления потока явля-

ется создание условий для реконцентрирования «размазанных» по огромному объему паров растворителя анализируемых компонентов в виде узких полос на входе в капиллярную колонку. Без стадии реконцентрирования работа системы теряет смысл. Получили распространение два способа реконцентрирования: низкотемпературное улавливание и так называемый эффект растворителя. Первый из них состоит в конденсации и задержке при низкой температуре (приблизительно на  $150^{\circ}\text{C}$  ниже температуры кипения компонентов) анализируемых соединений на начальном участке колонки. Растворитель при этом свободно проходит через колонку. После выхода зоны растворителя включается нагрев колонки и начинается процесс разделения и анализа.

Механизм эффекта растворителя более сложен. Экспериментально показано [32], что при поступлении в капиллярную колонку растворитель конденсируется на ее начальном участке. В первый момент по толщине слоя зона сконденсированного растворителя имеет гауссово распределение (рис. II.13,а). Под влиянием потока газа-носителя зона мигрирует. Слой сконденсированного растворителя можно рассматривать как пленку неподвижной фазы, поэтому относительная скорость миграции каждой узкой полосы зоны будет определяться толщиной пленки растворителя на участке, над которым должна двигаться данная узкая полоса. Поскольку толщина пленки жидкости в максимуме зоны в 100—300 раз превышает толщину пленки неподвижной фазы в остальной части колонки, скорость миграции фронтальных полос зоны будет намного превышать скорость миграции тыльных полос зоны. В результате через короткое время после начала миграции форма сконденсированной зоны станет сильно асимметричной с вертикальным тылом и сильно растянутым фронтом (рис. II.13,б).

Если вместе с растворителем в колонку вводят вещества, летучесть которых ниже летучести растворителя, они будут задерживаться у вертикальной границы сконденсированной зоны. При этом во времени полосы этих веществ должны сжиматься, так как их фронты надвигаются на очень толстую и все более увеличивающуюся по толщине пленку жидкого растворителя (фронт тормозится), а тыльные участки двигаются с гораздо более высокой скоростью по относительно тонкой пленке неподвижной фазы (тыл ускоряется). В этом суть реконцентрирующего механизма эффекта растворителя, который позволяет объяснить, в частности, непонятный на первый взгляд факт получения при вводе пробы без деления потока очень узких пиков шириной менее 1 с непосредственно вслед за пиком растворителя шириной 1—3 мин.

Таким образом, эффект растворителя проявляется только в случае правильно сформированной зоны сконденсированного растворителя. Условия формирования зоны определяются четырьмя независимо действующими факторами: температурой колонки,

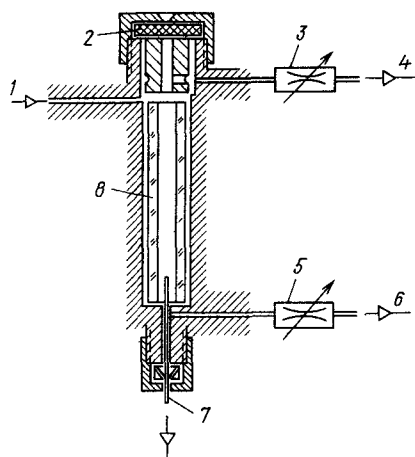
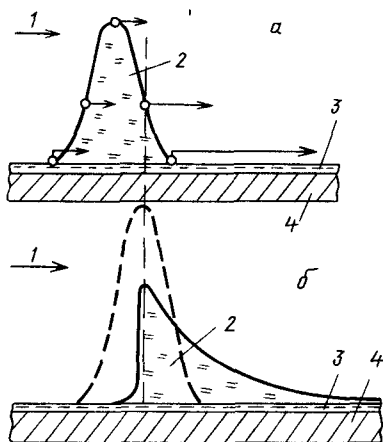


Рис. 11.13 Схема формирования зоны сконденсированного растворителя на начальном участке капиллярной колонки.

*а* — начальный момент времени, *б* — стационарная форма зоны, 1 — поток газа носителя, 2 — зона сконденсированного растворителя, 3 — пленка неподвижной фазы, 4 — внутренняя стенка капиллярной колонки

Рис. 11.14 Устройство для ввода пробы без деления потока:

1 — подача газа носителя, 2 — мембрана, 3, 5 — регулирующие вентили, 4, 6 — линии сброса, 7 — капиллярная колонка, 8 — стеклянный вкладыш

летучестью и количеством растворителя, временем дозирования. Роль указанных факторов проиллюстрируем конкретным примером: при вводе 1 мкл раствора образца в пентане без деления потока при комнатной температуре колонки эффект реконцентрирования не достигается. Что можно предпринять, чтобы достигнуть улучшения результата?

1. При сохранении неизменными природы и количества растворителя понизить температуру колонки до  $10^{\circ}\text{C}$  за счет использования хладагента. Хотя существует общее правило — температура начала колонки должна быть на  $10\text{--}30^{\circ}\text{C}$  ниже температуры кипения растворителя, варьирование температуры в указанном интервале может оказаться полезным.

2. При сохранении неизменной температуры колонки и количества пробы использовать в качестве растворителя гексан вместо пентана. Важно, чтобы пик растворителя не перекрывал на хроматограмме пики определяемых компонентов пробы. Чем более тяжелые компоненты анализируются, тем выше может быть температура кипения используемого растворителя. Известен пример, когда при анализе микроконцентраций тетрахлорбензодиоксида в колонку при  $210\text{--}220^{\circ}\text{C}$  вводили 2 мкл раствора образца в тетрадекане (температура кипения  $253^{\circ}\text{C}$ ). В тех случаях, когда замена растворителя пробы по тем или иным причинам неприемлема, можно одним шприцем ввести чистый растворитель другой

природы (например, гептан, 1 мкл), при условиях, когда образование сконденсированной зоны гарантировано, а затем вторым шприцем через минимальный интервал времени (как правило, около 5 с) — анализируемую пробу (раствор в пентане, 1 мкл).

3. При сохранении неизменными температуры колонки и природы растворителя объем пробы увеличивают от 1 до 2 мкл. Объем вводимой пробы ограничивается не только вместимостью колонки, но и возможным избытком растворителя, при котором начинают образовываться кроме сконденсированной зоны на стенках также капли, которые переносятся газом-носителем с гораздо более высокой скоростью, чем сама сконденсированная зона.

Схема инжектора для реализации способа ввода пробы без деления потока, предложенная его авторами [33], представлена на рис. II.14. Инжектор снабжен двумя линиями сброса 4, 6 с регулирующими вентилями 3, 5. Поток (около 5 мл/мин), оmywающий мембрану, сбрасывается через линию 4, а отдувка инжектора от остаточных паров растворителя с расходом около 50 мл/мин осуществляется через линию 6. При вводе пробы линия 4 открыта, а 6 — закрыта. Поршень шприца рекомендуется опускать медленно (в течение 10—20 с), чтобы пары образца поступали сразу в колонку 7 без расширения в зону, прилегающую к мембране, или в подводящие газ-носитель коммуникации. Если ввод пробы осуществлять слишком быстро, то это приведет к потере части образца с потоком 4, однако эффекты «памяти» и в этом случае исключаются. Линия 6 открывается через 30—60 с после завершения дозирования. Эта схема легла в основу конструкции дозаторов, работающих по принципу ввода пробы без деления потока, большинства современных капиллярных хроматографов.

Системы ввода пробы без деления потока получают широкое распространение благодаря следующим преимуществам: разбавленные экстракты природных и промышленных объектов могут дозироваться без дополнительной обработки; анализироваться может широкий спектр веществ в полном удовлетворяющем требованиям газовой хроматографии диапазоне летучести; аппаратное оформление достаточно простое.

К недостаткам рассмотренной техники ввода следует отнести: плохую воспроизводимость времен удерживания компонентов, выходящих сразу за пиком растворителя; отсутствие эффекта реконцентрирования для компонентов, элюируемых перед растворителем; количественную дискриминацию очень тяжелых компонентов, разложение термолабильных соединений из-за длительного нахождения паров образца в горячей зоне инжектора. Указанные недостатки частично могут быть устранены в системах ввода, которые работают без испарения образца, а позволяют жидкую пробу непосредственно ввести в капиллярную колонку.

**Системы прямого ввода.** В системах ввода пробы для капиллярной газовой хроматографии, использующих принцип прямого ввода пробы в колонку [34, 35], преодолены те недостатки, которые присущи рассмотренным выше системам с делением потока или без деления с помощью обогреваемого испарителя. При прямом вводе образец попадает в начало колонки в исходном агрегатном состоянии — в виде жидкости при температуре, не превышающей температуру кипения растворителя. Поскольку стадии испарения образца при высоких температурах и перенос паров вещества при этом способе ввода отсутствуют, то фактически исключаются такие отрицательные эффекты, как молекулярно-массовая «дискриминация» по высококипящим компонентам, взаимодействие полярных компонентов с активной поверхностью испарителя и соединительных линий, разложение термолабильных соединений.

Как показала практика, системы прямого ввода обеспечивают также более высокую воспроизводимость количественных результатов по сравнению с системами с испарением образца. Помимо указанных причин, это еще связано с тем, что при прямом вводе пробы имеется меньшее число ответственных за воспроизводимость количественных результатов переменных. В частности, отсутствуют такие параметры, как отношение деления или величина сбрасываемого потока, а также (для систем ввода без деления) время дозирования. Кроме того, исключаются ложные пики, связанные с продуктами уноса или «памятью» самоуплотняющейся мембраны.

Первые конструкции систем прямого ввода отличались простотой. Они состояли из вентиля и направляющей втулки, которые служили для ввода очень тонкой иглы шприца внутрь капиллярной колонки и для уплотнения системы ввода в процессе анализа и температурного программирования.

Одно из критических требований к подобным системам состоит в том, чтобы с целью исключения «дискриминации» компонентов температура зоны, куда вводится проба, была ниже, чем температура кипения растворителя. В первых конструкциях начальная зона колонки не снабжалась независимой системой терморегулирования. Ее температура целиком определялась температурой термостата колонок. Это ограничение было снято в конструкциях систем прямого ввода со вторичным охлаждением [36]. Однако вторичное охлаждение становится мало эффективным, когда температура термостата больше чем на 60 °С превышает температуру кипения растворителя. Воспроизводимость количественных результатов также существенно зависит от того, насколько герметична система в период дозирования. Потери части пробы вместе с газом-носителем должны быть исключены. Поддержание на достаточно низком уровне предела обнаружения микропримесей в системе прямого ввода обеспечивается возмож-



ностью дозирования больших объемов пробы (1—5 мкл) без ухудшения эффективности работы разделительной колонки, т. е. при реализации рассмотренных выше эффектов реконцентрирования [37].

## *Глава 4*

### **ДЕТЕКТОРЫ ДЛЯ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

В газовой хроматографии используют более 50 типов детекторов. Описание работы многих из них представлено в ряде обзоров и книг [38—46]. Практически все они могут быть условно разделены на неионизационные и ионизационные. Детекторы также подразделяются на неdestructивные и destructивные, универсальные и селективные, причем большинство ионизационных детекторов являются селективными и destructивными, а большинство неионизационных — универсальными и неdestructивными. Destructивным детектором является тот, в котором более чем 1% анализируемых компонентов разлагается или реагирует с образованием других соединений. Ионизационным детектором называют такой детектор, в котором анализируемые соединения под действием различных внешних факторов ( $\beta$ -излучение, захват электрона, водородное пламя, УФ-свет, высокочастотный заряд и др.) превращаются в отрицательные или положительные ионы, которые собираются на электродах и регистрируются с помощью усилителя и вторичного регистрирующего прибора. Большинство отечественных и зарубежных фирм, выпускающих газохроматографическую аппаратуру, включают в состав прибора не более 5—6 детекторов, причем обычно 2—3 из них постоянно установлены на хроматографе, а остальные прилагаются в качестве сменных или поставляемых по специальным заявкам. К основным детекторам, как правило, относят детектор по теплопроводности (ДТП), детектор по плотности (ДП); детектор термоионный (ДТИ); детектор электронного захвата (ДЭЗ) и др.

#### **4.1. НЕИОНИЗАЦИОННЫЕ ДЕТЕКТОРЫ**

##### **4.1.1. Детекторы по теплопроводности (ДТП)**

Детекторы по теплопроводности различных конструкций широко используют в аналитической, препаративной и промышленной газовой хроматографии. Так, в США 70% всех газовых хроматографов имеют ДТП. Это объясняется следующими преимуществами ДТП: простота и низкая стоимость как самого детектора, так и электронных блоков к нему; универсальность (возможность анализа практически любых веществ); достаточ-

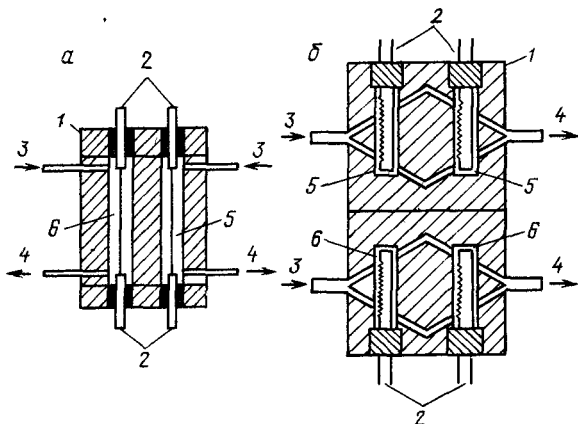
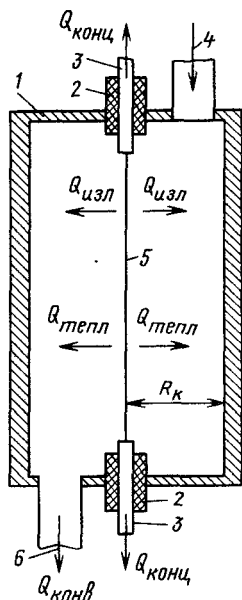


Рис II 15. Камера ДТП:

1 — корпус камеры, 2 — изоляторы, 3 — держатели чувствительного элемента, 4 — вход газа-носителя, 5 — чувствительный элемент, 6 — выход газа-носителя

Рис II 16. Конструкции двухплечевой (а) и четырехплечевой (б) ДТП.

1 — корпус детектора, 2 — чувствительные элементы, 3 — вход газа-носителя, 4 — выход газа, 5 — сравнительная камера (камеры), 6 — рабочая камера (камеры)

ная чувствительность для многих хроматографических анализов; высокая линейность в области сравнительно больших концентраций; хорошая воспроизводимость и стабильность работы и показаний.

ДТП обычно состоит из камеры в металлическом корпусе, через которую продувается поток газа-носителя. Чувствительный элемент детектора (проволочное сопротивление или термистор) помещен в центре камеры (чаще всего коаксиально ее стенкам). При нагреве чувствительного элемента от любого источника стабилизированного постоянного напряжения возможны 4 вида потерь тепла: за счет теплопроводности газа-носителя ( $Q_{\text{тепл}}$ ); за счет конвекции газового потока в камере детектора ( $Q_{\text{конв}}$ ); за счет излучения ( $Q_{\text{изл}}$ ); концевые потери ( $Q_{\text{конц}}$ ) через соединения нагретого элемента с подводящими ток проводами.

На рис. II.15 представлена принципиальная схема камеры с указанием видов потерь тепла. Так как абсолютное измерение тепловых потерь от нагретого элемента трудно осуществить, обычно применяют разностный метод измерения, причем два чувствительных элемента объединяют в одном блоке. Одну камеру, через которую пропускают чистый газ-носитель, называют сравнительной, а другую, в которую поступает поток газа-носителя из хроматографической колонки, — рабочей. В сравнительной и

рабочей камере устанавливаются по два чувствительных элемента или, чаще, в детекторе имеется по две сравнительных и рабочих камеры. Чувствительные элементы в случае двух камер являются двумя плечами мостовой схемы, а ДТП обычно называется двухплечевым, четыре чувствительных элемента являются четырьмя плечами моста, а ДТП называют четырехплечевым (рис. II.16).

При пропускании чистого газа-носителя через все камеры детектора мост сбалансирован и сигнала нет. Когда выходящая из колонки проба попадает в рабочую ячейку (или ячейки) детектора, теплопроводность смеси (газ-носитель + проба) изменяется. В связи с этим меняется температура чувствительного элемента в рабочей камере, а следовательно, и его сопротивление. Получается разбаланс моста, являющийся сигналом ДТП, который затем регистрируется.

Различие конструкций ДТП может быть связано как с устройством камер детектора, так и с устройством и расположением чувствительных элементов.

По тому, каким образом газ-носитель проходит через ДТП, камеры детектора разделяют на проточные, диффузионные и проточно-диффузионные. На рис. II.17 приведены три типа камер ДТП для четырехплечевых детекторов. Проточные камеры малоинерционны (постоянная времени менее 1 с), зато чувствительны к колебаниям расхода газа-носителя. Диффузионные камеры обладают значительно большей инерционностью (постоянная времени может достигать до 20 с), однако они практически нечувствительны к изменениям расхода газа через детектор. Проточно-диффузионные камеры обладают промежуточными характеристиками.

Корпус ДТП обычно изготавливают из металла (нержавеющей стали, латуни, алюминия), он массивен для сглаживания колебаний внешней температуры. Для анализа агрессивных веществ корпус детектора изготавливают из никеля или монеля, а иногда из фторопласта (тефлона) или стекла. Диаметр камер

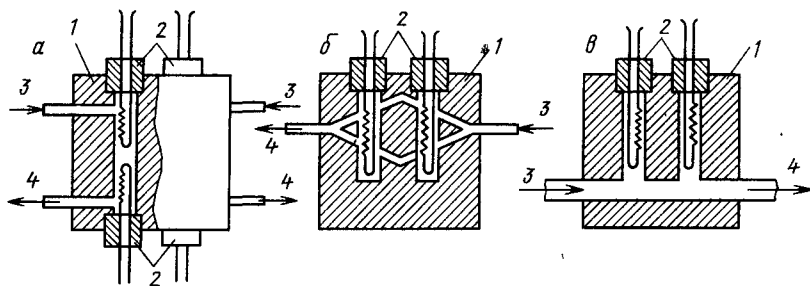


Рис. II.17. Четырехходовой ДТП с проточной (а), проточно-диффузионной (б) и диффузионной (в) камерами:

1 — корпус детектора, 2 — чувствительные элементы, 3 — вход газа-носителя, 4 — выход газа

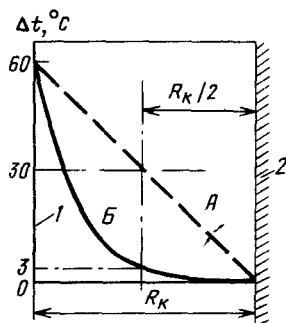


Рис. II.18. Линейная (А) и экспериментальная (Б) зависимость изменения температуры от чувствительного элемента к стенке камеры ДТП: 1 — чувствительный элемент, 2 — стенка камеры,  $R_K$  — радиус камеры детектора

ДТП, работающих с аналитическими колонками, обычно от 3 до 6, а длина от 20 до 60 мм. Для капиллярных колонок большого диаметра ( $> 0,5$  мм) разработаны камеры ДТП диаметром около 1 мм и длиной 20—30 мм. Рабочий объем такого ДТП не превышает 15—20 мкл.

На рис. II.18 приведено изменение температуры от элемента к стенке камеры детектора, равное  $60^\circ\text{C}$ , причем температура в середине расстояния от элемента до стенки равна не  $30^\circ\text{C}$ , а только  $3^\circ\text{C}$ . Опытным путем показано, что основное падение температуры происходит недалеко от нагретого чувствительного элемента ДТП (меньше 1 мм от элемента), а увеличение диаметра камеры выше 2 мм почти не влияет на потери тепла и, следовательно, на чувствительность детектора. Для термисторных детекторов размеры камеры обычно меньше.

Конструкции чувствительных элементов ДТП могут различаться по типу чувствительного элемента. Существуют проволочные и термисторные 5 чувствительные элементы (рис. II.19). Проволочные элементы изготовляют в виде нитей и спиралей. Иногда применяют двойные спирали. Нитевые элементы имеют очень малую инерционность, однако трудно получить большое сопротивление прямой нити накала с сохранением оптимальных характеристик детектора. Поэтому нитевые элементы полностью заменены на спиральные, причем на сравнительно небольшой длине спирали можно получить сопротивление до 100 Ом и более.

Материал чувствительного элемента определяется не только необходимостью получения высокого сопротивления, но и свойствами анализируемых веществ. Фирма «Gow-Mac» (США) для анализа агрессивных веществ предлагает, например, проволочные чувствительные элементы из никеля (12,5 и 25 Ом), золоченого вольфрама (24 и 48 Ом), платино-иридиевые (12 Ом) и тефлонированные вольфрамовые (18 Ом) элементы. Термисторные шарики для защиты от разрушающего действия газа-носителя ( $\text{H}_2$ ) и анализируемых веществ обычно покрыты тонкой стеклянной оболочкой. Чем выше сопротивление чувствительного элемента, тем выше и его чувствительность. Обычно для чув-

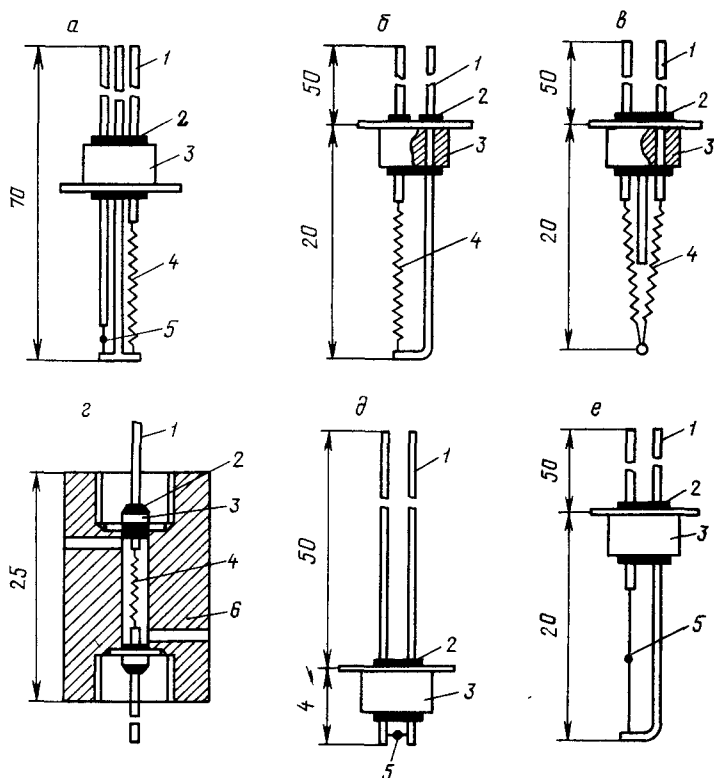


Рис. П 19. Конструкции чувствительных элементов ДТП фирмы «Gow-Mac» (США):

*а* — совмещенные проволочный и термисторный элементы, *б* — проволочный элемент в виде спирали, *в* — двойная спираль, *г* — коаксиальное расположение чувствительного элемента *д* — термисторный элемент микро-ДТП, *е* — термисторный элемент, 1 — держатель, 2 — изолятор, 3 — корпус элемента, 4 — спираль, 5 — термистор, 6 — корпус детектора

ствительного элемента приводится паспортное значение сопротивления  $R_0$  в «холодном» состоянии (например, при  $25^\circ\text{C}$ ). Чем больше значение  $R_0$  для данного чувствительного элемента, тем больше его сопротивление в нагретом состоянии  $R_t$  и тем выше значение  $R_{t_1} - R_{t_2}$ , которое определяет разбаланс моста.

Сигнал детектора для элементов с высоким температурным коэффициентом сопротивления больше.

Существует 4 режима работы ДТП: постоянного тока, постоянного напряжения на чувствительных элементах, постоянной температуры чувствительных элементов и постоянной средней температуры этих элементов. Показано, что чувствительность в режиме постоянной температуры в 7—10 раз выше, однако отношение сигнала к шуму и пределы детектирования во всех

случаях близки. В режимах постоянного тока и напряжения линейность повышается при высоких концентрациях анализируемых веществ в связи с более высокими потерями тепла на концах чувствительных элементов.

Предложено много схем блоков управления ДТП (БУДТП), различающихся не только принципом действия, но и наличием дополнительных элементов и схем для стабилизации работы блока и устранения влияния некоторых внешних факторов. Однако для получения высокой чувствительности ДТП наибольшее значение имеют электрическая и механическая стабильности работы самого детектора, точность поддержания температуры детектора, давления и расхода газа-носителя через детектор. Колебания температуры в комнате могут отражаться на постоянстве сопротивления резисторов БУДТП и, следовательно, на стабильности его работы. Необходимо также по возможности уменьшать переменную составляющую постоянного тока моста и термические эффекты электродвижущей силы.

Для успешной работы с детектором по теплопроводности рекомендуется в качестве газа-носителя использовать гелий. Для получения оптимальных характеристик гелий должен быть как можно чище. Для предохранения элементов детектора от перегорания и окисления необходимо сначала подать поток газа-носителя, а затем включить ток моста и выключить ток прежде, чем прекратится подача газа-носителя. По этим же причинам после выключения прибора, особенно после проведения анализов при высоких температурах, рекомендуется продувать газ-носитель до охлаждения детектора с целью предотвращения обратной диффузии воздуха к нагретым элементам детектора. Для увеличения продолжительности работы элементов ДТП следует работать при наинизшей температуре элементов (токе моста), необходимой для данного анализа. Для получения максимальной чувствительности следует увеличивать ток моста, принимая во внимание, однако, инертность, термическую и химическую стабильность анализируемых веществ. Порог чувствительности большинства соединений не превышает нескольких микрограммов. Чувствительность увеличивается пропорционально току моста в третьей степени и

$$\Delta T = T_g - T_{ст},$$

где  $T_g$  и  $T_{ст}$  — температуры чувствительного элемента и стенки камеры

Хроматографическая система должна быть полностью герметичной. Нестабильность нулевой линии часто является результатом течей, причем воздух попадает в систему газа-носителя, даже находящуюся под давлением. Для предотвращения конденсации пробы необходимо поддерживать температуру детектора выше температуры колонки. Все блоки детектора (регистратор,

термостат, источник питания, мост и др.) должны быть заземлены с использованием одного заземляющего провода. Необходимо обеспечить стабильность расхода газа-носителя, для чего следует использовать точные регуляторы потока; прекратить работу, если кончается газ-носитель в баллоне и сменить баллон.

#### 4.1.2. Детектор по плотности (ДП)

Детектор по плотности (ДП) был впервые описан Мартином. Однако предложенный им детектор был настолько сложен по устройству, что, несмотря на некоторые последующие упрощения, не нашел достаточно широкого применения. Предложена более простая конструкция детектора по плотности, схема которого приведена на рис. II.20. Чувствительными элементами детектора могут быть как проволочные элементы, так и термисторы, причем чувствительности таких детекторов различаются незначительно и равны  $8-20 \cdot 10^{-6}$  мг/мл для бутана. Работа детектора основана на изменении давления в вертикальной трубке, заполненной газом 2, выходящим из хроматографической колонки, при попадании в нее вместе с газом-носителем анализируемого компонента. Изменение давления в этом канале пропорционально изменению плотности газового потока.

С увеличением давления в детекторе разность плотностей газов в верхней и нижней частях детектора возрастает и увеличивается чувствительность детектора. Чувствительность ДП уменьшается с увеличением температуры. Это является недостатком при анализе высококипящих соединений, однако для анализа постоянных газов и летучих органических веществ этот недостаток не играет существенной роли.

Выбор газа-носителя для ДП имеет большое значение. Наилучшими газами-носителями являются газы с низкой теплопроводностью и высокой теплоемкостью. Это необходимо для того, чтобы тепло от нагреваемых чувствительных элементов отводилось в основном за счет уноса его с газом-носителем, а детектор был бы чрезвычайно чувствительным к изменениям потока. Поэтому для получения высокой чувствительности на ДП применение газов-носителей He и  $H_2$  не рекомендуется. Однако при использовании таких газов, как Ar,  $N_2$  и  $CO_2$ , чувствительность детектора не хуже, чем чувствительность ДТП с газами-носителями  $H_2$

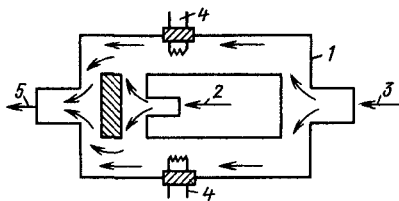


Рис II.20 Схема детектора плотности  
1 — корпус детектора, 2 — вход потока газа-носителя из колонки в детектор, 3 — вход сравнительного потока, 4 — чувствительные элементы детектора, 5 — выход газа из детектора

и Не. Это является большим преимуществом ДП, так как Не сравнительно дорогой газ, а  $\text{H}_2$  — взрывоопасен. Кроме того, следует также иметь в виду, что газ-носитель и анализируемые вещества должны значительно различаться по молекулярной массе

Для ДП характерен высокий линейный диапазон ( $5 \cdot 10^5$ ) и возможность расчета по его показаниям количества компонента, если известна его молекулярная масса. Поэтому при работе с ДП не требуется проведения калибровки, кроме введения 5% поправки для газа-носителя водорода, учитывающей его высокую теплопроводность. С применением двух и более газов-носителей могут быть рассчитаны молекулярные массы анализируемых соединений с целью их идентификации.

ДП используют для определения молекулярных масс соединений с температурой кипения до  $400^\circ\text{C}$ . Погрешность определения составляет около 4%, что вполне достаточно для большинства случаев идентификации компонентов по их молекулярной массе. Например, для гептана ( $\text{C}_7\text{H}_{16}$ ;  $M = 100$ ) различия в молекулярной массе  $\pm 2$  единицы достаточно, чтобы не спутать его с другими соединениями, имеющими близкие к гептану удерживаемые объемы. При определении молекулярной массы расход газов через детектор необходимо поддерживать постоянным. Размер пробы знать не обязательно.

В нашей стране газовые хроматографы с ДП серийно не выпускаются.

#### 4.1.3. Пламенно-фотометрический детектор (ДПФ)

Впервые пламенно-фотометрический детектор (ДПФ) был предложен для обнаружения серы и фосфорсодержащих соединений в воздухе в 1962 г. В 1966 г. был создан первый ДПФ специально для газовой хроматографии.

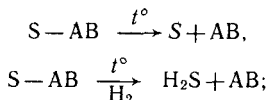
В связи с высокой чувствительностью при детектировании серо- и фосфорсодержащих соединений ДПФ широко применяют в хроматографической практике. Его серийно выпускают большинство ведущих в области хроматографического приборостроения фирм. Принцип действия детектора основан на возбуждении анализируемых соединений в обогащенном по водороду пламени. При возвращении возбужденных молекул в основное состояние возникает эмиссия света на определенной длине волны, характерной для данного соединения. Интенсивность характеристической длины волны является количественной мерой испускающего ее соединения. Эмиссия света регистрируется фотоумножителем, который выдает сигнал в виде хроматографического пика. Основное применение ДПФ нашел для анализа серосодержащих органических и неорганических соединений. В связи с тем, что ДЭЗ и ДТИ обладают более высокой чувствительностью к фос-



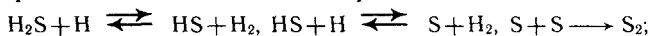
форсодержащим соединениям, они составляют конкуренцию ДПФ при анализе этих соединений. ДПФ достаточно чувствителен и селективен также к галогенам, азоту, бору, таким металлам, как олово, хром, селен и германий. ДПФ был использован для анализа алифатических вторичных аминов и их производных. Такие соединения, как  $\text{CO}$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}_4$ ,  $\text{SO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{F}_4$ ,  $\text{HF}$ ,  $\text{CS}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ , которые практически не определяются с помощью пламенно-ионизационного детектора (ДПИ) анализируются на ДПФ с высокой чувствительностью.

Пламя в ДПФ выполняет три функции: в горячей зоне пламени исходные соединения, содержащие серу, разлагаются; из продуктов разложения прямо или косвенно выделяются атомы серы; в более холодной зоне пламени образуются возбужденные молекулы серы  $\text{S}_2^*$ . Можно представить следующие реакции, происходящие в ДПФ:

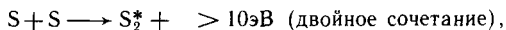
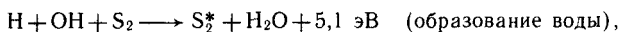
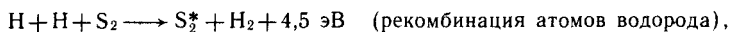
а) на первой стадии в горячей области водородного пламени происходит разложение исходных серосодержащих соединений ( $\text{S}-\text{AB}$ ) с образованием атомов серы или сероводорода:



б) на второй стадии происходят различные обратимые реакции в верхней части пламени с образованием  $\text{S}_2$ :



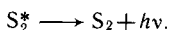
в) на третьей стадии молекулы серы возбуждаются по одному из механизмов:



где  $\text{M}$  — третье тело.

Вопрос о том, какой из этих механизмов истинный или преобладает над другими, остается открытым;

г) на четвертой стадии в холодном внешнем конусе пламени возбужденная молекула серы возвращается в основное состояние и происходит излучение света в диапазоне длин волн от 300 до 450 нм:



Наиболее интенсивные полосы эмиссии серы приходятся на 384,0 и 394,1 нм. Имеются и другие пики средней интенсивности при 374,1; 404,7 и 415,0 нм.

Рабочие параметры одного из типичных ДПФ для анализа серосодержащих соединений следующие: темновой ток фотоумно-

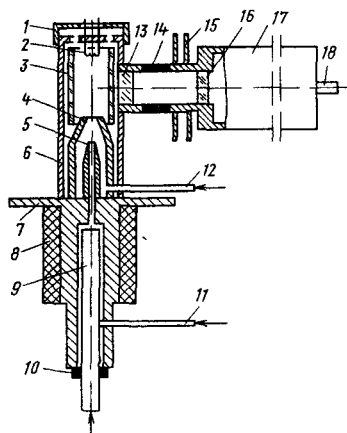


Рис. II.21. Принципиальная конструкция пламенно-фотометрического детектора хроматографа «Агат»:

1 — крышка, 2 — спираль поджига, 3 — кварцевая трубка, 4 — конус, 5 — горелка, 6 — корпус ДПФ, 7 — основание, 8 — нагреватель, 9 — колонка, 10 — уплотнение, 11 — вход водорода, 12 — вход воздуха, 13 — тепловой фильтр, 14 — теплоизолятор, 15 — радиатор, 16 — оптический фильтр, 17 — фотоумножитель, 18 — коаксиальный разъем к усилителю

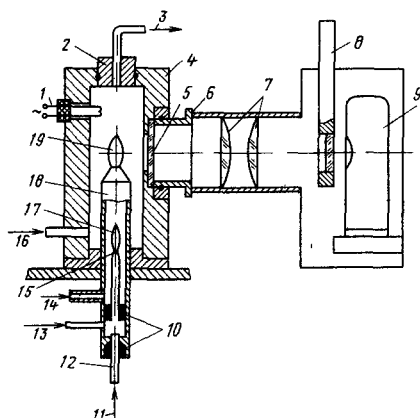


Рис. II.22. Конструкция двухпламенного ДПФ фирмы «Varian» (США):

1 — спираль поджига, 2 — крышка, 3 — выход газов, 4 — корпус, 5 — тепловой фильтр, 6 — тепловой разъем, 7 — линзы, 8 — оптический фильтр, 9 — фотоумножитель, 10 — уплотнения, 11 — вход газа носителя, 12 — хроматографическая колонка, 13 — вход воздуха, 14 — вход водорода, 15, 18 — горелки, 16 — вход воздуха, 17, 19 — нижнее и верхнее пламя

жителя  $4 \cdot 10^{-9}$  А; фоновый ток с пламенем  $2 \cdot 10^{-8}$  А; уровень шумов с пламенем  $2 \cdot 10^{-10}$  А; предел детектирования по сере  $10^{-10}—10^{-11}$  г/с; диапазон детектирования  $0—10$  млн. $^{-1}$ ; линейный диапазон  $10^2—10^3$ ; селективность по отношению к углеводородам (S/C)  $10^4—10^5$ ; чувствительность (наклон зависимости  $\lg \varepsilon—\lg C$ ) 1,7—2,0; максимальная рабочая температура 300—350 °С.

Конструкция ДПФ хроматографа «Агат» (завод «Манометр», Москва) представлена на рис. II.21.

Детектор состоит из основания 7 с обычной водородной горелкой 5 и конуса 4, ограничивающего пламя. В ДПФ подается газ-носитель из хроматографической колонки 9, водород 11 и воздух 12. В детекторе предусмотрены спираль для поджига пламени 2, светонепроницаемая крышка 1, теплоизолятор 14 и радиатор 15. Эмиссия пламени через кварцевую трубку 3, тепловой фильтр 13 и оптический фильтр 16 попадает на фотоумножитель 17, коаксиальный разъем которого 18 соединен с электрометрическим усилителем. Для анализа соединений, содержащих Р и S, пригодны оптические фильтры, пропускающие максимальную длину волны 526 и 394 нм, соответственно. Иногда используют двухканальные детекторы, на которых при наличии одного пламени можно одновременно регистрировать

Р и S, применяя два разных оптических фильтра и два фотомножителя.

Фирма «Varian» (США) выпускает двухпламенные ДПФ (рис. П.22). В нижнем пламени 17 происходит сгорание органических веществ, в том числе растворителя. В верхнем пламени 19 наблюдается эмиссия представляющих интерес молекул. Детектор более устойчив при вводе больших концентраций органических веществ.

Зависимость сигнала ( $\sigma$ ) ДПФ от массы попадающего в детектор содержащего серу анализируемого вещества ( $m$ ) нелинейна и выражается уравнением:

$$\sigma = Km^n,$$

где  $K$  и  $n$  — постоянные для выбранных экспериментальных условий

В большинстве случаев значения  $n$  равны 1,5—2. Линейный динамический диапазон (ЛДД) для ДПФ обычно составляет  $10^2$ . Применение логарифмических усилителей и представление сигнала в логарифмических координатах с наклоном зависимости  $\lg \sigma - \lg m$ , равным 2, позволяет увеличить ЛДД до  $10^3$ . Предел обнаружения для соединений, содержащих фосфор, обычно составляет около  $1 \cdot 10^{-12}$  г/с фосфора. Предел обнаружения галогенсодержащих соединений составляет  $10^{-6}$ — $10^{-11}$  моль. Измерение  $\text{SO}_2$  и  $\text{H}_2\text{S}$  в воздухе можно проводить на уровне  $< 0,1$  млн. $^{-1}$ .

ДПФ позволяет определять с высокой чувствительностью металлорганические соединения путем введения в пламя ДПФ предварительно очищенной фтором кварцевой ваты или кварцевого стержня. Наблюдаемая поверхностная люминесценция, например, при детектировании органических соединений олова (эмиссия в области 390 нм) и при температуре ДПФ не менее 200—300 °С дает возможность получить один из самых чувствительных методов детектирования в хроматографии. Предел детектирования олова составляет  $5 \cdot 10^{-16}$  г/с или  $4 \cdot 10^{-18}$  моль/с. Недостатком детектора является отравление поверхности кварца с течением времени. Присутствие фтора в анализируемом соединении улучшает стабильность работы детектора и его время жизни.

Широкое применение находят ДПФ в высокоэффективной газовой хроматографии с кварцевыми капиллярными колонками. Изучены эффекты подавления чувствительности ДПФ к сере в присутствии примесей в газе-носителе или при неполном разделении серосодержащего соединения с пиком основного компонента. В качестве тестовых применяли смеси Р- и S-содержащих веществ в *n*-октане при концентрациях  $5 \cdot 10^{-7}$ — $5 \cdot 10^{-6}$  г/мл. При исследовании влияния примесей углеводов на показания ДПФ и экспоненту  $n$  в уравнении, связывающим сигнал детектора с массой поступающего в него анализируемого вещества, ис-

пользовали циклогексан и метан, причем первый добавляли к раствору тиофена в октане, а второй при расходе 0,5 мл/мин смешивали с газом-носителем. При увеличении температуры ДПФ от 100 до 190 °С высота пика тиофена в присутствии циклогексана уменьшалась на 5,7—10% соответственно по сравнению с чистым сигналом.

В связи с широким применением ДПФ при анализе проб окружающей среды исследовано влияние паров воды на показания детектора. В присутствии паров воды показания ДПФ увеличились для тиофена на 12% и для бутилмеркаптана на 25%. Концентрацию паров воды в газе-носителе измеряли детектором по теплопроводности. При высоких температурах хроматографической колонки подавление сигнала может быть связано с улетом неподвижной фазы. При 130 °С улет неподвижной фазы (5% SE-30 на хромосорбе W) соответствует потоку циклогексана  $1,4 \times 10^{-3}$  г/с, т. е. потоку, при котором начинает заметно проявляться подавление сигнала. Присутствие углеводородов и воды не влияет на величину экспоненты  $n$ .

Присутствие летучих органических соединений серы в газе-носителе или пробе снижает чувствительность однопламенных детекторов, причем чувствительность падает экспоненциально с ростом концентрации мешающих примесей. Такое резкое уменьшение чувствительности можно объяснить деактивацией возбужденных молекул при их рекомбинации или столкновении с органическими соединениями и продуктами их разложения, причем эмиссия  $S_2^*$  уменьшается по всему диапазону длин волн от 300 до 400 нм. Одной из трудностей при работе с однопламенным ПФД является возможность гашения пламени при вводе жидких проб анализируемых веществ в растворителе объемом более 1 мкл.

Чувствительность ДПФ зависит от интенсивности эмиссии света, связанной с хемилюминесценцией. Интенсивность эмиссии увеличивается с уменьшением температуры пламени и увеличением расхода водорода в диффузном пламени. Температура пламени уменьшается с относительным уменьшением массы горючих газов и увеличением теплопроводности газа-носителя ( $H_2$  или He по сравнению с  $N_2$ ). Если расход горючих газов уменьшается, фоновый ток и уровень шумов ДПФ также уменьшаются, при этом отношение сигнала к шуму становится больше. Предполагают, что показания ДПФ пропорциональны концентрации  $H_2$  в третьей степени. По этой причине обычно работают при высоких концентрациях  $H_2$  и точном контроле расхода. Максимальная концентрация  $H_2$  лимитируется нестабильностью пламени, которое может погаснуть при выходе пиков растворителя или основных компонентов. При использовании  $H_2$  в качестве газа-носителя для капиллярных колонок важно поддерживать поток постоянным с целью проведения количественных из-

мерений с малой погрешностью. Предпочтителен в качестве газ-носителя He по сравнению с  $H_2$ .

Температура ДПФ влияет на фоновый ток и уровень шумов, поэтому важно поддерживать ее постоянной. Так как линейный диапазон детектирования для ДПФ мал, необходимо экспериментально определять экспоненту  $n$  в уравнении зависимости показаний ДПФ от массы, которая для различных конструкций детектора может быть различна. С целью повышения чувствительности детектора к серосодержащим соединениям иногда в водородное пламя добавляют  $SO_2$  или другие содержащие серу газы. Возможности снижения уровня шумов сильно ограничены значительно большим влиянием пламени на шум по сравнению с электрическими источниками помех. Доля уровня шумов от пламени эквивалентна сигналу, полученному от концентрации  $SO_2$ , равной 5 млрд.<sup>-1</sup>

На основе сказанного выше может быть сделан вывод, что достигнутые к настоящему времени пределы детектирования для ДПФ близки к теоретическим. Должны быть созданы новые конструкции детекторов или исследованы новые принципы эмиссионного детектирования. Одним из возможных путей в разработке ДПФ нового поколения может быть создание беспламенных детекторов.

#### 4.2. ИОНИЗАЦИОННЫЕ ДЕТЕКТОРЫ

Характерными признаками ионизационных методов детектирования является возникновение в камере детектора положительных или отрицательных ионов под действием различных источников ионизации на поступающие в детектор анализируемые вещества и наличие электрометрических усилителей для регистрации малых сигналов ионизационных детекторов в виде незначительных изменений постоянного фонового тока детектора. В присутствии заряженных частиц в межэлектродном пространстве и через измерительный резистор  $R_n$  протекает ток  $I$ . В результате на  $R_n$  возникает падение напряжения  $U$ . Если через детектор протекает чистый газ-носитель, концентрация заряженных частиц и ток детектора будут постоянными. При попадании компонента в детектор концентрация заряженных частиц в общем случае увеличивается. Увеличивается ток, который вызывает дополнительное падение напряжения на  $R_n$ . Появляется сигнал детектора, который регистрируется в виде пика.

Например, для ионизационного детектора при попадании в него органического вещества сигнал может быть  $10^{-12}$  А при фоновом токе  $10^{-14}$  А. Чтобы получить напряжение, необходимое для регистрации, ток должен проходить через высокое сопротивление нагрузки  $R_n$  ( $10^9$ — $10^{10}$  Ом). При соединении такого сопротивления с регистратором, имеющим более низкое входное

сопротивление ( $> 10^3$  Ом), общее сопротивление цепи настолько уменьшается, что сигнал не регистрируется. Усилитель, следовательно, устанавливается между сопротивлением нагрузки и регистратором и служит для согласования низкого сопротивления измерительного прибора с высоким сопротивлением нагрузки. Стандартный усилитель обычно дает возможность также переключать полярности и масштабы сигнала.

Фоновый ток ионизационного детектора целесообразно компенсировать противоположно направленным током такой же величины. При этом в отсутствие пробы тока практически нет и на регистраторе записывается нулевая линия. Для компенсации фонового тока применяют источники дополнительного компенсационного напряжения. Используют в основном два различных метода компенсации: компенсацию по напряжению и компенсацию по току.

Рассмотрим принцип действия и области применения некоторых типов ионизационных детекторов.

#### **4.2.1. Пламенно-ионизационный детектор (ДПИ)**

Пламенно-ионизационный детектор (ДПИ) является одним из наиболее распространенных и популярных детекторов в газовой хроматографии. Впервые ДПИ был предложен и описан в 1958 г. С тех пор этот детектор по всем характеристикам не был превзойден ни одним из вновь предложенных детекторов.

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

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

Процессы, происходящие в ДПИ, можно представить следующим образом:

1.  $\text{H}_2 + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{горение}} \text{H}_2\text{O}$  (уносится избытком воздуха);
2.  $\text{АОВ} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{горение}} \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + e^- + (\text{ионы})^+$   
(неосновной процесс),
3.  $\text{АОВ} \xrightarrow{\text{диссоциация}} \text{СН}^*$  (возбуждение)
4.  $2\text{СН}^* + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{окисление}} 2\text{СНО}^+ + 2e^-$   
(основной процесс),

где АОВ — анализируемое органическое вещество.

Предложенный механизм детектирования объясняет экспериментальные данные, полученные с ДПИ, и в том числе пропорциональность сигнала детектора числу атомов углерода в молекуле углеводорода.

Все конструкции ДПИ содержат следующие элементы: корпус детектора, горелку, электроды, издляторы, вводы воздуха, водорода и газа-носителя, спираль для поджигания пламени. Корпус детектора обычно представляет собой металлический цилиндр, который должен разбираться таким образом, чтобы был удобный доступ к электродам и горелке детектора.

На рис. II.23 приведена конструкция ДПИ для хроматографа ЛХМ 80. Отличительными особенностями представленной конструкции являются близкое расположение выхода колонки 12 по отношению к горелке 9, наличие спирали 6 для поджига пламени и дополнительное охлаждение изолятора коллекторного электрода 3 с помощью радиатора 17.

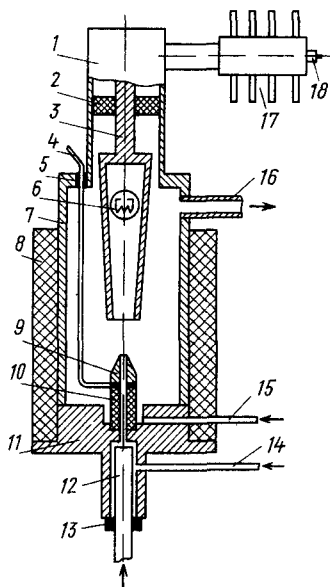


Рис. II.23. Принципиальная конструкция ДПИ хроматографа ЛХМ 80:

1 — крышка, 2, 5, 10 — изоляторы, 3 — коллекторный электрод, 4 — электрический ввод потенциального электрода, 6 — спираль поджига, 7 — корпус ДПИ, 8 — нагреватель, 9 — горелка и потенциальный электрод, 11 — основание ДПИ, 12 — колонка, 13 — уплотнение, 14 — вход водорода, 15 — вход воздуха, 16 — выход из детектора, 17 — радиатор, 18 — коаксиальный разъем

Горелки ДПИ обычно изготавливают из нержавеющей стали, никеля или кварца. К материалу горелки предъявляется три требования: он должен обладать термической и химической стабильностью и не должен плавиться при температуре водородного пламени. Форма пламени имеет большое значение для работы ДПИ. Существует определенное соотношение между расходами водорода, газа-носителя и диаметром сопла горелки. Поэтому при работе с заполненными колонками и при расходе газа-носителя около 30—50 см<sup>3</sup>/мин этот диаметр обычно составляет 0,5—0,8 мм. Для капиллярных колонок применяют горелки с выходным отверстием около 0,3 мм. Некоторые фирмы прилагают набор горелок с различными диаметрами отверстий. Электроды детектора с целью увеличения их термической и химической стабильности обычно изготавливают из никеля или нержавеющей стали и полируют. Расстояние между электродами определяется размером пламени и влияет на чувствительность, уровень шумов и напряжение питания.

ДПИ можно применять при достаточно высоких температурах (например, выше 500 °С), причем наиболее жесткие требования предъявляются к изоляторам электродов. Поэтому изоляторы чаще всего изготавливают из керамики и размещают в достаточно горячей части детектора. Иногда изолятор предохраняют от контакта с потоком газа-носителя и пробы из колонки и с продуктами их сгорания. Такое размещение изолятора позволяет работать с ДПИ длительное время без его очистки и ухудшения характеристик детектора. Для дополнительного охлаждения изоляторов их выносят в холодную зону или обдувают потоком газа.

Отрицательный электрод не должен раскаляться в пламени во избежание термоионной эмиссии с металлической поверхности отрицательного электрода. Расстояние между электродами не имеет большого значения. Оно влияет на напряжение, необходимое для достижения тока насыщения. Например, при обычно применяемых расстояниях от 10 до 12 мм может потребоваться напряжение от 40 до 180 В. При расстоянии выше 15 мм увеличивается уровень шумов.

В ДПИ применяют обычно три газа: газ-носитель, водород и воздух. В качестве газа-носителя чаще всего используют азот, иногда водород или гелий. Водород или воздух необходимы для горения пламени. Ко всем газам предъявляются следующие требования: в газах не должно содержаться примесей органических веществ и солей щелочных металлов; в газах не должно быть пыли, которая приводит к нестабильности горения пламени, вызывая резкое увеличение шумов детектора; для получения нужной температуры пламени необходимо правильное соотношение азота и водорода. Недостаток воздуха приводит к неполному сгоранию и уменьшению чувствительности. Большой избыток воздуха уве-



личивает шумы детектора в связи с появлением турбулентности потока. Небольшое количество влаги в газах не оказывает сильного влияния на работу ДПИ.

Для поджигания пламени в ДПИ на уровне сопла горелки или выше устанавливается небольшая спираль, нагреваемая электрическим током. Выше или рядом с пламенем иногда помещается термopapa, по которой контролируется наличие пламени. В этом случае может быть сделана система автоматического поджигания пламени при охлаждении термopapapы.

В некоторых конструкциях ДПИ предусмотрен автоматический поджиг пламени при неоднократном его угасании, и если пламя не поджигается, выключается подача водорода. В хроматографе «Кристалл-2000» (ОКБА, г. Йошкар-Ола) перед поджигом пламени автоматически вдвое увеличивается расход  $H_2$  и после поджига также автоматически устанавливается прежний расход. Если пламя не загорелось, производится автоматический поджиг до 3 раз, после чего фиксируется аварийное состояние хроматографа. Контроль за наличием пламени осуществляется по фоновому току ДПИ.

Визуальный контроль за пламенем производится по зеркальной поверхности. При поднесении палочки с зеркалом на конце к выходу детектора с горящим пламенем на зеркальной поверхности появляются капельки воды, что свидетельствует о наличии пламени.

В связи с широким применением в газовой хроматографии программирования температуры чаще всего применяют дифференциальный ДПИ с двумя одинаковыми колонками при строго одинаковых экспериментальных параметрах как в колонке, так и в детекторе. Это позволяет устранить влияние колебаний расхода газа-носителя и температуры, связанных с загрязнением газа-носителя и улетом неподвижной фазы из колонки, на фоновый ток детектора. Кроме того, такое применение позволяет значительно снизить дрейф нулевой линии и улучшить стабильность работы детекторов. В этом случае один из детекторов, в который поступает анализируемая проба, является рабочим, а другой сравнительным.

ДПИ является одним из наиболее линейных детекторов в газовой хроматографии. По различным оценкам его линейный диапазон детектирования составляет  $10^6$ — $10^7$ . Проведено исследование линейности ДПИ для летучих углеводородов  $C_1$ — $C_6$  с использованием в качестве газа-носителя  $He$ ,  $N_2$ ,  $Ar$  и их смесей. Показано, что для улучшения линейности ДПИ в области больших концентраций могут быть использованы полученные экспериментально методом экспоненциального разбавления поправочные коэффициенты.

Чувствительность ДПИ пропорциональна содержанию атомов углерода в исследуемом веществе. Для насыщенных угле-

водородов довольно точно соблюдается следующее соотношение:

$$K_c = M/12N,$$

где  $K_c$  — поправочный коэффициент площади пика,  $M$  и  $N$  — молекулярная масса и число атомов углерода анализируемого соединения

Коэффициент  $K_c$  для метана, пропана, гептана и октана равен 1,33; 1,22; 1,19 и 1,18 соответственно. Коэффициент  $K_c$  переводит, таким образом, показания ДПИ на грамм вещества в показания на грамм углерода. После внесения поправок в показания детектора полученные значения применяют для вычисления состава смеси. Чувствительность ДПИ к определенному соединению зависит в основном от числа в молекуле атомов углерода, связанных с атомами водорода или с другими углеродными атомами. Небольшой вклад дают углеродные атомы, связанные с галогенами, amino- и гидроксильными группами. Содержание в молекуле полностью окисленных атомов углерода (таких, как карбоксильные или карбонильные группы) практически не влияет на чувствительность детектора.

Так как чувствительность ДПИ зависит от температуры пламени, необходимо поддерживать постоянными расход водорода и соотношение водорода и газа-носителя. ДПИ — типичный потоковый детектор, поэтому его показания (площадь пика) не зависят от расхода газа-носителя и определяются количеством вещества, поступающего в детектор в единицу времени (например, в г/с). Однако, поскольку с изменением расхода газа-носителя изменяется состав газов в пламени, чувствительность все же незначительно меняется.

ДПИ не может быть использован для анализа, например, таких соединений, как:  $\text{COS}$ ,  $\text{CS}_2$ ,  $\text{SO}_2$ ,  $\text{NO}$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{SiCl}_4$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{HCOOH}$ ,  $(\text{COOH})_2$ ,  $\text{SiF}_4$  и некоторых других. Следует особо отметить, что ДПИ не только не чувствителен к перечисленным соединениям, но его чувствительность к другим соединениям не изменяется в их присутствии, если концентрация этих соединений не настолько велика, чтобы изменить состав пламени. Это свойство отличает ДПИ от большинства других ионизационных детекторов и дает ему неоспоримые преимущества, особенно при обнаружении загрязнений в воздухе и анализе водных смесей, таких как спиртные напитки, биологические и пищевые экстракты.

Среди других характеристик ДПИ можно отметить следующие: высокое быстродействие (малая постоянная времени); небольшой рабочий объем (возможность применения с капиллярными колонками); максимальная температура использования до  $500^\circ\text{C}$ ; дешевый газ-носитель ( $\text{N}_2$ ); сравнительно низкая стоимость детектора. Недостатками ДПИ являются: нечувствительность к ряду соединений; деструктивность; взрывоопасность (в связи с применением  $\text{H}_2$ ); необходимость электрометрического усилителя.

Соблюдение правил работы с ДПИ позволяет получать данные, трудно достижимые с другими типами детекторов. Одними из основных правил являются следующие.

1. Соблюдать установленные для данной конструкции детектора расходы газов и строго выдерживать соотношение газа-носителя, водорода и воздуха.

2. Для получения точных количественных результатов необходима калибровка для каждого анализируемого вещества. Использование поправочных коэффициентов иногда приводит к значительным ошибкам.

3. Нелетучие продукты сгорания могут откладываться на электродах и изоляторах, нарушая стабильность работы ДПИ; загрязнение изоляторов может способствовать адсорбции ими воды, вызывая ухудшение качества изоляции и появление токов утечки. Это необходимо всегда помнить при анализе соединений, содержащих Si, и при применении силиконовых неподвижных фаз.

4. Прогреть детектор перед включением термостата колонок до температуры выше 100 °С с целью предотвращения конденсации примесей, содержащихся в газе-носителе и неподвижной фазе, на стенках детектора, изоляторах и электродах. Не выключать пламя и обогрев детектора до охлаждения термостата колонок.

#### 4.2.2. Фотоионизационный детектор (ДФИ)

Детектор был предложен в 1968 г., имел нестабильные характеристики и почти не применялся. В конце 70-х начале 80-х годов началась новая эра в развитии ДФИ, связанная, главным образом, с его применением для анализа примесей в воздухе. Новые конструкции детектора имеют чувствительность и линейность на уровне или выше тех же параметров ДПИ, причем в качестве газа-носителя можно использовать воздух. Детектор применяют в портативных и автономных газовых хроматографах, специально разработанных для целей охраны окружающей среды [42].

Проведено изучение работы ДФИ с различными газами-носителями, определены его линейности и чувствительности для большого круга органических веществ. Испробовано применение ДФИ с капиллярными колонками. В качестве источника возбуждения использован лазер, с помощью которого исследован механизм двухфотонной фотоионизации для анализа полиатомных ароматических соединений. Оптимизированы параметры детектора.

Принцип работы ДФИ состоит в следующем: фотоны от ультрафиолетовой (УФ) лампы попадают в ионизационную камеру, через которую непрерывно проходит газ-носитель, выбранный таким образом, чтобы его потенциал ионизации  $I_p$  был значительно выше энергии фотонов. В этом случае газ-носитель

не ионизируется, в то время как попадание в ионизационную камеру анализируемого вещества вызывает появление фотоионизационного тока, пропорционального концентрации этого вещества. Диапазон детектируемых соединений ограничен «сверху» — детектируются все соединения, в том числе и неорганические, для которых потенциал ионизации меньше энергии фотонов. Различные УФ-лампы могут обеспечить разную селективность ДФИ к различным соединениям за счет сведения сигнала к некоторым из них до минимума. В этом случае можно определять даже неразделенные хроматографические пики. Однако такого рода селективность ограничена выбором источников излучения, что в первую очередь связано с отсутствием материалов, пропускающих свет более коротковолновый, чем резонансное излучение аргона. Коротковолновая граница пропускания для ДФИ находится ниже 11,7 эВ.

Теоретические вычисления чувствительности ДФИ не дают достоверных результатов. Однако практически установлено, что ДФИ в среднем и в зависимости от типа соединения в 10—30 раз более чувствителен и имеет в 10 раз больший линейный диапазон детектирования, чем ДПИ. Наряду с этим использование воздуха в качестве газа-носителя и отсутствие пламени дают ДФИ неоспоримые преимущества по сравнению с ДПИ.

Принципиальная схема ДФИ приведена на рис. II.24. Свет от УФ-лампы 4 через окно 5 из  $MgF_2$  попадает в ионизационную камеру 10 с потенциальным 7 и измерительным 6 электродом. Через трубку, являющуюся потенциальным электродом 7, в камеру из хроматографической колонки поступает газ-носитель. В качестве источника фотоионизации применена криптоновая УФ-лампа 4 тлеющего разряда типа КрРМ-2 с окном 5 из монокристалла  $MgF_2$  толщиной 1 мм. Лампа питается от стабилизированного источника питания УИП-1, фотоионизационный ток регистрируется измерителем малых токов ИМТ-05. Ионизационная

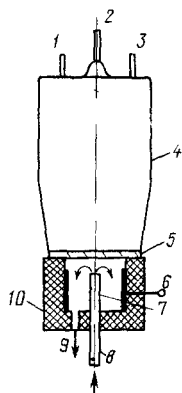


Рис. II.24. Схема фотоионизационного детектора:

1—3 — электроды УФ-лампы, 4 — УФ-лампа, 5 — окно из  $MgF_2$ , 6 — измерительный электрод (к усилителю), 7 — потенциальный электрод, 8 — вход газа носителя из колонки, 9 — выход газа из детектора, 10 — ионизационная камера

камера изготовлена из высокоомной керамики с электродами из нержавеющей стали. Электроды и окно приклеены к керамическому корпусу специальным клеем. Максимальная рабочая температура такого детектора около 200 °С.

Разработано много различных конструкций ДФИ, однако серийно детекторы выпускаются лишь зарубежными фирмами: «HNU Systems Inc.» (США), «Tracog» (США), «Fotovak» (США); «Perkin-Elmer» (США). При разработке детектора основные трудности связаны с технологией его изготовления, в том числе герметизацией УФ-лампы, окна из  $\text{MgF}_2$  и ионизационной камеры, выбором формы и материалов электродов при минимальном размере камеры и др.

Одним из недостатков ДФИ является возможность загрязнения окна из  $\text{MgF}_2$  компонентами газа-носителя, пробы и неподвижной фазы. Загрязнение приводит к уменьшению потока фотонов и к значительной потере чувствительности.

Фирма «Fotovak» (США) выпускает портативный газовый хроматограф модели 10-A-10 («Аэроскан») с ДФИ для определения следов органических соединений в атмосфере. С помощью прибора можно определять органические вещества в 1 см<sup>3</sup> пробы воздуха в количестве 0,1 млрд. <sup>-1</sup>. Преимущества прибора определяются высокостабильным источником фотонов с энергией  $\approx 11$  эВ, который питается от высокочастотного генератора. Характерной особенностью прибора является возможность его применения при температуре окружающей среды, поэтому основные детали детектора изготовлены из фторопласта. Для проведения хроматографического анализа сложных многокомпонентных смесей предусмотрена быстрая смена хроматографических колонок. В хроматографе модели 10-A-10 в качестве газа-носителя используют специально очищенный и высушенный воздух. Применение воздуха в качестве газа-носителя имеет преимущества, в том числе возможность детектирования электроотрицательных соединений, например фреонов, не подверженных прямой ионизации фотонами с энергией  $< 11$  эВ. Детектирование происходит по механизму электронного захвата благодаря наличию кислорода в газе-носителе. Хроматограф полностью автономен. Для работы в полевых условиях предусмотрен встроенный баллон с газом-носителем.

Экспериментально установлено, что отношение сигналов ДПИ и ДФИ является критерием для идентификации органических соединений. Двойное детектирование позволяет определять классы органических веществ и в сочетании с измерением времен удерживания проводить идентификацию отдельных соединений. Объединенная система детекторов дает возможность расширять диапазон исследуемых соединений, давая сигналы для тех соединений, на которые не реагируют ДФИ.

Для идентификации многокомпонентных смесей может быть

применен набор фотоионизационных детекторов с различными УФ-лампами. Соотношение между сигналами ДФИ, например с УФ-лампами на 9,5 эВ и 11,7 эВ, позволяет получить дополнительную информацию о природе анализируемых веществ.

При работе с ДФИ в режиме ДЭЗ в качестве газа-носителя используют азот с примесью легко ионизируемого с помощью УФ-лампы органического вещества. Образовавшиеся электроны собираются на аноде под влиянием электрического поля и дают фоновый ток, который уменьшается при захвате электронов электроотрицательными анализируемыми веществами. С помощью крана потоки газов-носителей переключаются таким образом, что детектор может последовательно работать в режимах ДФИ и ДЭЗ. Газом-носителем для режима ДЭЗ может служить азот с добавлением паров три-*n*-пропиламина или нафталина. Фоновый ток зависит от природы и количества добавок, интенсивности УФ-лампы и чистоты окна из  $\text{MgF}_2$ . Для получения фонового тока  $1 \cdot 10^{-8}$  А поток нафталина должен составлять около 1 мкг/мин. При этих условиях можно анализировать антрацен на уровне 500 пг. Поляризационное напряжение составляло около 200 В. Линейный диапазон для линдана и гептахлора около  $10^3$ .

Исследовано влияние температуры на показания ДФИ. Установлено, что дополнительная стабилизация температуры серийного ДФИ фирмы «HNU Systems» (США) снижает дрейф и шум детектора при фоновом токе  $3 \cdot 10^{-14}$  А. При этом ДФИ имеет большую ионизационную эффективность (0,3 Кл/гС) по сравнению с ДПИ (0,02 Кл/гС). Показано, что ДФИ той же фирмы с рабочим объемом ячейки 150 мкл может быть успешно применен с кварцевыми капиллярными колонками внутренним диаметром 300 мкм с использованием He в качестве газа-носителя и с дополнительным расходом потока He 20 см<sup>3</sup>/мин. При этом полная промывка ячейки осуществляется менее чем за 0,5 с, что вполне приемлемо для пиков шириной более 2 с.

Интерес к ДФИ постоянно повышается и многие фирмы планируют ввести его в состав своих хроматографов в качестве одного из основных детекторов. Например, в новых отечественных газовых хроматографах «Кристалл-3000» (ОКБА, г. Йошкар-Ола) и «Автохром» (ВНИИХром, г. Москва), также предполагается использование ДФИ.

#### 4.2.3. Электронозахватный детектор (ДЭЗ)

В 1957 г. Ловлок предложил детектор для определения электронного сродства органических соединений, основанный на захвате тепловых электронов в камере с радиоактивным источником. Было также установлено, что сродство некоторых веществ к электронам с тепловыми энергиями часто бывает связано с их биологической активностью. Последующие достиже-

ния при применении электрозахватного детектора для анализа органических, металлоорганических и неорганических соединений, токсичных соединений и пестицидов показали пригодность его для точных количественных измерений. Именно поэтому ДЭЗ находит широкое применение в химии, биологии, медицине, пищевой промышленности, сельском хозяйстве, парфюмерии и других областях.

Первоначально ДЭЗ применяли при постоянном напряжении питания на потенциальном электроде. Затем для сбора электронов стали применять короткие импульсы потенциала с более длительными интервалами между ними. Потенциалов с амплитудой 50 В и длительностью 0,5 мкс бывает обычно достаточно, чтобы собрать все присутствующие в детекторе электроны, и недостаточно, чтобы начался сбор отрицательных ионов на аноде. При интервале между импульсами длительностью около 100 мкс теряется не более 5% электронов, выделенных источником излучения, за счет рекомбинации и диффузии к стенкам детектора. Чтобы стандартизировать распределение электронов было предложено «термализовать» их, для чего включать электрическое поле только на короткое время (1 мкс). За это время все электроны успевают собраться на коллекторе и процессы «прилипания» электронов к молекулам идут в отсутствие электрического поля, т. е. когда электроны имеют, как и молекулы газа, практически тепловую энергию.

В качестве газа-носителя применяют аргон, содержащий некоторое количество какого-либо не захватывающего электроны газа или пара для приведения свободных электронов в тепловое равновесие с газом-носителем. Наиболее подходящим оказался метан с концентрацией 5—10%. Могут применяться и другие газы и пары ( $\text{CO}_2$ , пары воды,  $\text{H}_2$ ).

Предложены другие режимы работы ДЭЗ: при постоянном токе, при переменной частоте, вольтамперометрический режим и смешанные режимы работы.

Известны три основные конструкции ДЭЗ:

1. Детектор плоскопараллельной конструкции (рис. II.25) пригоден для работы в постоянном и импульсном режимах. Так как выходящий через анод поток газа-носителя не должен быть турбулентным, на поверхности анода укрепляется тонкая медная сетка. Расход газа для детектора с камерой диаметром около 10 мм должен быть всегда больше 100 см<sup>3</sup>/мин, чтобы уменьшить постоянную времени детектора и замедлить скорость дрейфа отрицательных ионов к аноду.

2. Детектор коаксиальной (цилиндрической) конструкции показан на рис. II.26. Сравнение плоскопараллельного и цилиндрического детекторов показало, что цилиндрический детектор менее селективный, однако вследствие возможности использования более мощного источника  $\beta$ -излучения ( $250 \text{ мКи}^3\text{H}_1$ ) обеспечи-

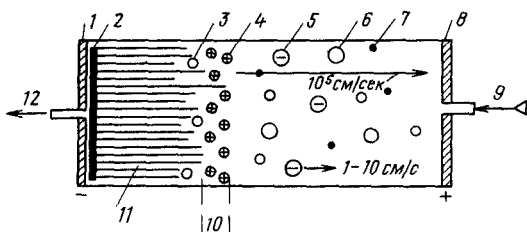
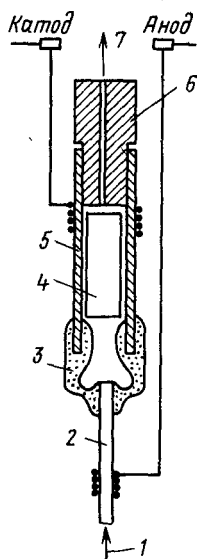


Рис. II.25. ДЭЗ плоско-параллельной конструкции:

1 — катод; 2 — радиоактивный источник, 3 — молекулы газа-носителя; 4 — положительные ионы газа-носителя; 5 — отрицательные ионы пробы; 6 — молекулы пробы; 7 — электроны, 8 — анод; 9 — вход газа-носителя; 10 — зона ионизации; 11 — β-частицы; 12 — выход газа из детектора. Скорость дрейфа электрона —  $10^5$  см/с; скорость дрейфа иона — 1–10 см/с; скорость газа-носителя в детекторе 1–2 см/с

Рис. II.26. Схема ДЭЗ коаксиальной конструкции:

1 — вход газа-носителя; 2 — анод; 3 — изолятор; 4 — трубчатый радиоактивный источник, 5 — катод; 6 — заглушка-изолятор; 7 — выход газа

вает почти на порядок большую чувствительность, чем плоско-параллельный ( $100 \text{ мКи}^3\text{Н}_1$ ). Небольшой объем цилиндрического детектора (всего 0,7 мл) позволяет работать при более низком расходе газа ( $\text{N}_2$ ). Сравнение этих детекторов при оптимальных условиях с двумя газами-носителями при постоянном и импульсном питании показало, что коаксиальный детектор более линеен и имеет большую чувствительность.

3. Детектор двухкамерной конструкции обеспечивает защиту радиоактивного источника от контакта с пробой, выходящей из хроматографической колонки. Для извлечения электронов из камеры с источником применяют третий дополнительный электрод. При этом исключаются побочные эффекты прямой ионизации от радиоактивного источника и можно использовать другой более стабильный радиоактивный источник, способный выдерживать более высокую температуру. На рис. II.27 приведены 4 схемы основных типов ДЭЗ, выполненные в одном корпусе.

Коаксиальный ДЭЗ газового хроматографа модели 3700 фирмы «Varian» (США) работает по методу импульсного питания постоянным током. Конструкция детектора и схема питания приведены на рис. II.28. В представленной схеме ДЭЗ непосредственно введен в электронную схему обратной связи. На электрод с радиоактивным источником 2 подаются отрицательные импульсы напряжения от регулируемого генератора частоты 7. Образованные в ячейке ДЭЗ с чистым газом-носителем свободные электроны движутся к коллектору навстречу потоку газа-



носителя и, собираясь на коллекторе, дают ионизационный ток. Исходная частота импульсов контролируется электронной схемой таким образом, чтобы ионизационный ток был равен току сравнения, который имеет постоянную величину и подается от источника частоты сравнения 10 на электрометрический усилитель 8. При попадании захватывающей электроны пробы в детектор автоматически возрастает частота импульса пропорционально концентрации анализируемого соединения. Выходной сигнал электрометрического усилителя 8 представляет собой напряжение, пропорциональное частоте импульсов. Разность частот пропорциональна концентрации пробы в детекторе.

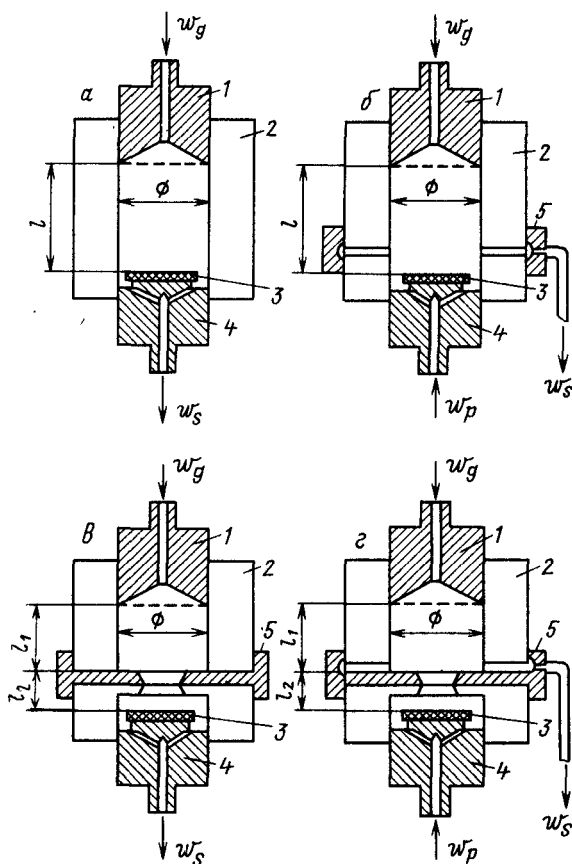


Рис. II.27. Схема ДЭЗ трехэлектродной двухкамерной плоско-параллельной конструкции:

а — двухэлектродный; б — двухэлектродный, двухкамерный с поддувом; в — трехэлектродный; г — трехэлектродный с поддувом; 1 — анод; 2 — корпус; 3 — радиоактивный источник; 4 — катод; 5 — дополнительный электрод  $W_g$  — поток из детектора;  $W_s$  — сброс;  $W_p$  — дополнительный поток

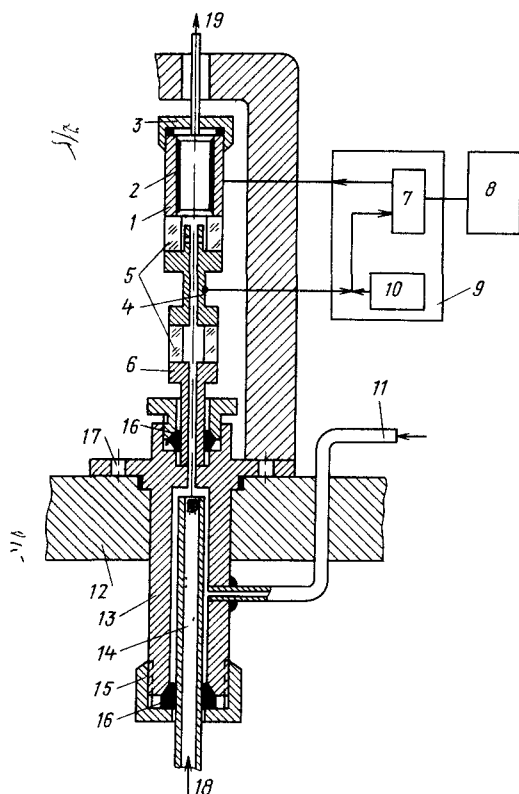


Рис. II.28. Конструкция и электрическая схема коаксиального ДЭЗ хроматографа модели 3700 (завод «Хроматограф», г. Москва):

1 — катод, 2 — радиоактивный источник, 3 — крышка, 4 — втулка, 5 — изоляторы, 6 — газовый разъем, 7 — источник импульсов переменной частоты, 8 — электрометрический усилитель, 9 — блок питания ДЭЗ, 10 — источник частоты сравнения, 11 — вход дополнительного потока, 12 — крышка термостата колонок, 13 — основание детектора, 14 — колонка, 15 — гайка, 16 — уплотнения, 17 — крепление детектора, 18, 19 — вход и выход газа носителя

Чувствительность ДЭЗ зависит от сродства анализируемых молекул к электрону, которое изменяется в широких пределах.

Вероятность электронного захвата для разных молекул зависит от присутствия в молекуле какого-либо захватывающего атома или от ее структуры. Углерод и водород почти не имеют сродства к электронам и углеводороды поэтому не захватывают свободных электронов. Кислород и галогены, напротив, легко захватывают свободные электроны с образованием стабильных отрицательных ионов. Молекулы, содержащие эти атомы, захватывают электроны, причем возможность захвата электрона зависит от возможности диссоциации гетероатома. Так, эфиры слабо или совсем не захватывают электроны, а ангидриды, пероксиды и дикетоны являются сильно захватывающими элек-

троны веществами. Для галогенов степень поглощения электронов возрастает с легкостью диссоциации галогена в ряду  $I > Br > Cl > F$ . Среди углеводородов исключением являются ароматические соединения (такие, как циклооктатрен, антрацен), которые являются сильно захватывающими электроны веществами.

Линейный диапазон детектирования различных типов ДЭЗ находится в пределах  $10^2$ — $10^4$ . Линейность ДЭЗ с  $^{63}\text{Ni}$ -источником, работающим в режиме импульсного питания с интервалами между импульсами от 100 до 200 мкс, может быть значительно увеличена путем аналогового преобразования сигнала в линейную функцию концентрации пробы. При различных температурах и интервалах между импульсами преобразованные таким образом показания ДЭЗ линейны до 98% насыщения детектора. При этом линейный диапазон составляет  $1 \cdot 10^5$ , т. е. на два порядка выше обычного. В общем случае считается, что если проба дает сигнал, равный 30% от фонового тока, то работа детектора происходит в линейной области.

Чувствительность детектора (как коаксиального, так и плоско-параллельного) уменьшается с увеличением расхода газа-носителя.

Применяемый для электронозахватного детектора газ-носитель необходимо тщательно осушить и очистить. Непосредственная информация о наличии примесей в газе, поступающем в детектор, может быть получена из измерений фонового тока детектора, который должен быть заранее определен для всех интервалов импульсов и значений постоянного напряжения. Новый ДЭЗ необходимо проверять с чистой пустой колонкой и газом-носителем высокой степени чистоты. Кроме того, колонка, система ввода пробы и соединительные трубки должны быть предварительно тщательно очищены и стабилизированы при максимальной возможной температуре.

При выполнении количественного анализа с помощью ДЭЗ следует учитывать потери пробы за счет адсорбции на носителе, неподвижной фазе и поверхности аппаратуры при анализе очень малых количеств компонентов, а также возможность окисления кислородом газа-носителя анализируемых соединений.

Для поддержания максимальной эффективности и чувствительности при работе с ДЭЗ необходимо соблюдать следующие меры предосторожности:

- работать при наинизшей необходимой для данного анализа чувствительности детектора, уменьшать чувствительность за счет разбавления потока газа-носителя перед вводом в детектор или сокращения длительности периода между импульсами;

- уменьшать активную адсорбционную поверхность, соприкасающуюся с пробой, и объем колонок;

вводить пробу непосредственно в колонку без применения специальных испарителей;

поддерживать температуру детектора несколько выше температуры колонки с целью устранения конденсации пробы и неподвижной фазы в детекторе;

использовать небольшие пробы (не более  $10^{-9}$  г) сильно захватывающих электроны веществ (например, линдана), так как большие пробы насыщают ДЭЗ на несколько часов;

поддерживать достаточно высокий расход газа через детектор (не менее 40—100 см<sup>3</sup>/мин для различных типов детекторов) для продувки всех мертвых объемов перед детектором;

использовать колонку при температуре не выше максимальной рекомендуемой для неподвижной фазы, так как пары неподвижной фазы в противном случае не сжигаются, как, например, в ДПИ, а будут накапливаться и конденсироваться, что приведет к потере чувствительности детектора;

не применять в колонке в качестве неподвижных фаз вещества, способные захватывать электроны, такие как амиды, амины, галогенуглеродные соединения, нитрилы, хиноны и другие соединения;

периодически очищать детектор, нагревая его до максимально возможной температуры в течение нескольких дней с одновременной продувкой чистым и сухим газом;

очищать натуральные экстракты от сопутствующих примесей настолько это возможно перед вводом их в хроматограф для сведения до минимума возможного загрязнения детектора пробой (уменьшение фонового тока, происходящее после каждого ввода пробы, показывает, что детектор загрязняется соединениями, присутствующими в пробе);

использовать количественный универсальный детектор совместно с ДЭЗ с целью упрощения калибровки и облегчения расшифровки данных;

проводить обязательную калибровку детектора для каждого определяемого соединения, при этом вводимая проба должна иметь такой размер, чтобы сигнал детектора не превышал 30% тока насыщения, не использовать в качестве растворителей пробы соединения, способные захватывать электроны, например кетоны, спирты, галогенсодержащие вещества и др.

ДЭЗ может быть применен для количественного определения токсичных соединений в воздухе, для определения остатков пестицидов, гербицидов, инсектицидов и некоторых других соединений в биологических жидкостях, пищевых продуктах и других объектах; в биологии — для анализа аминов, токсичных соединений, гормонов, канцерогенных веществ и метаболитов; для определения летучих галогенсодержащих соединений в различных пробах с чрезвычайно высокой чувствительностью; для анализа металлоорганических и неорганических соединений. ДЭЗ применяют

также для анализа духов, спиртных напитков и в других областях.

Для ДЭЗ получен пока еще непревзойденный до настоящего времени абсолютный рекорд чувствительности детектирования в хроматографии, равный  $1,6 \cdot 10^{-19}$  моль для N,N'-дипентафторбензоилпентафторанилина. Получение такой чувствительности особенно перспективно с точки зрения использования ДЭЗ для определения следов биологически важных молекул, которые, как правило, содержат функциональные группы, необходимые для образования сильно захватывающих электроны производных.

#### 4.2.4. Термоионный детектор (ДТИ)

Название детектора — термоионный применяют для детектирующих систем, в которых ионизационный ток возникает благодаря термически генерированным ионам. По механизму детектирования ДТИ можно подразделить на три группы: поверхностно-ионизационные и два варианта пламенно-термоионных с одной и двумя горелками.

При исследовании явлений термоэлектронной эмиссии еще в 1940 г. было замечено, что нагретая до красного каления платина излучает положительные ионы. Эмиссия положительных ионов объяснялась присутствием на аноде солей щелочных металлов. В дальнейшем был предложен способ обнаружения течей, основанный на применении индикатора положительных ионов, имитируемых под воздействием галогенсодержащих соединений. Датчик галогенного течеискателя представляет собой диод прямого накала, работающий при атмосферном давлении и являющийся фактически простейшим поверхностно-ионизационным термоионным детектором. Кремер с сотрудниками в 1960 г. разработали детектор с избирательной чувствительностью к галогенсодержащим соединениям, причем сигнал детектора оказался пропорционален числу атомов галогена в молекуле.

Термоионный детектор с одной горелкой, предложенный в 1964 г., широко используют в газовой хроматографии. Детектор состоит из обычного пламенно-ионизационного детектора, в который вводится специальный металлический или керамический зонд, являющийся источником атомов щелочных металлов и помещаемый несколько выше горелки. Возможно размещение над горелкой электрода, предварительно обработанного соответствующей солью щелочного металла. В большинстве ДТИ этих конструкций соль во время работы детектора нагревалась до необходимой температуры пламенем водородной горелки.

Рассмотрим современные конструкции ДТИ с одной горелкой. Нестабильность работы ДТИ ранних конструкций объяснялась быстрым истощением источника соли щелочного металла, связанным с его разрушением, а также с влиянием пламени на температуру солевого резервуара. За последние годы приняты по-

пытки создания ДТИ нового поколения, в которых резервуар с солью вынесен из зоны пламени. Примером одного из таких детекторов могут служить ДТИ хроматографа «Агат» (ПО «Манометр», г. Москва), названный авторами термоаэрозольным (ДТА) [41]. Изучение механизма работы детектора показало, что основные процессы в детекторе происходят в пламени, а соль служит только источником атомов щелочного металла.

Принципиальная конструкция детектора приведена на рис. II.29.

Детектор представляет собой комбинацию обычного ДПИ с генератором аэрозоля соли щелочного металла. Генератор аэрозоля состоит из трех частей: термостатируемой камеры 21 для испарения соли щелочного металла из резервуара 22 в потоке инертного газа 16, необходимого для транспортирования паров соли в пламя детектора; охлаждаемой с помощью водяного холодильника 20 зоны для превращения паров соли в

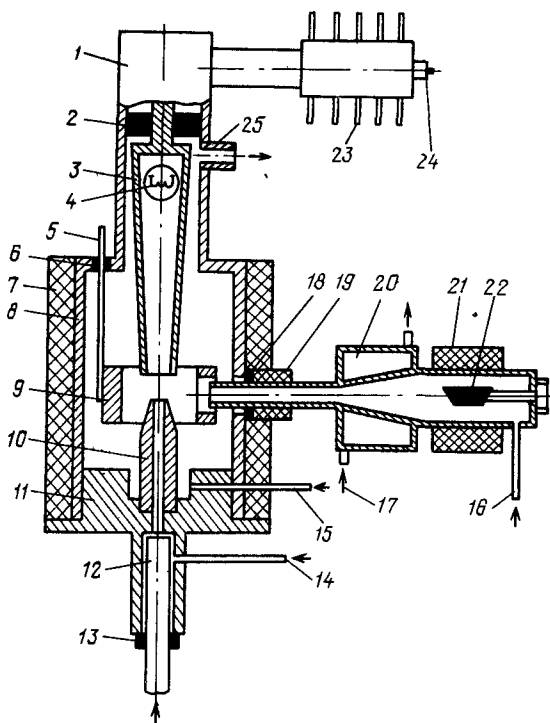


Рис II.29 Принципиальная конструкция ДТИ хроматографа «Агат»:

1 — крышка, 2, 6 — изоляторы, 3 — измерительный электрод, 4 — спираль поджига, 5 — ввод потенциального электрода, 7 — нагреватель, 8 — корпус ДТИ, 9 — потенциальный электрод, 10 — горелка, 11 — основание ДТА, 12 — колонка, 13, 18 — уплотнения, 14 — вход водорода, 15 — вход воздуха, 16 — вход газа ( $N_2$ ) в генератор аэрозоля, 17 — ввод воды, 19 — конусное сопло, 20 — водяной холодильник, 21 — термостатируемая камера, 22 — резервуар с солью CsBr, 23 — радиатор, 24 — коаксиальный разъем к электрометру, 25 — выход газов из детектора

монодисперсные аэрозольные частицы и конусного сопла 19 для локального ввода аэрозоля в зону пламени. Размеры, материал и размещение генератора аэрозоля относительно пламенно-ионизационного детектора выбираются таким образом, чтобы исключить распад и коагуляцию аэрозольных частиц до момента попадания их в пламя.

На потенциальный электрод детектора 9 подается положительное напряжение от 100 до 300 В; горелка 10 и «минус» источника питания заземлены. Сигнал с измерительного электрода 3 подается через разъем 24 на вход электрометрического усилителя и регистрируется потенциометром.

Соль щелочного металла испаряется в термостатируемой камере 21, температура которой с помощью терморегулятора поддерживается с точностью  $\pm 0,1^\circ\text{C}$ . Температура нагрева соли около  $500^\circ\text{C}$ . Образовавшийся пар потоком инертного газа выносится в охлаждаемую часть конденсатора и под действием поля с большим температурным градиентом охлаждается, переходит в состояние перенасыщения и затем в аэрозоль. Монодисперсность аэрозоля достигается путем разбавления его большим потоком инертного газа. Детектор может работать более 2000 ч без замены резервуара с солью при постоянстве чувствительности и величины фоновых токов. Количество CsBr в резервуаре 22 около 1 г. Перед установкой в генератор соль нагревается в течение 20—30 ч при  $400^\circ\text{C}$  для удаления летучих загрязнений, увеличивающих уровень шумов и дрейф детектора.

На рис. II.30 представлена конструкция ДТИ фирмы «Carlo Erba» (Италия), в котором применяют обогреваемую пламенем таблетку с солью щелочного металла. Держатель таблетки 9 и потенциальный электрод 8 перемещаются относительно друг друга, изолированной горелки 11 и измерительного электрода 7. Соль испаряется с таблетки 9 под действием пламени 10 и попадает в зону между потенциальным 8 и измерительным 7 электродами, где происходит ионизация и детектирование анализируемых веществ.

Фирма «Patterson Detector Eng. Technology» (США) предложила новую конструкцию ДТИ, схема расположения электродов и источника соли которого представлена на рис. II.31, а конструкция приведена на рис. II.32. Детектор может работать в двух режимах термоионного детектирования и в режиме каталитического беспламенного ионизационного детектирования. Режимы изменяются путем вариации состава электрически нагреваемого термоионного и каталитического источников и смеси газов, используемых в детекторе. Термоионный источник для первого режима работы ДТИ имеет высокую концентрацию атомов Cs в керамической основе 8 (рис. II.31), работает в атмосфере  $\text{N}_2$ , обеспечивает очень высокую селективность и предел детектирования на уровне наногаммов для соединений, содержащих электроотрицательные

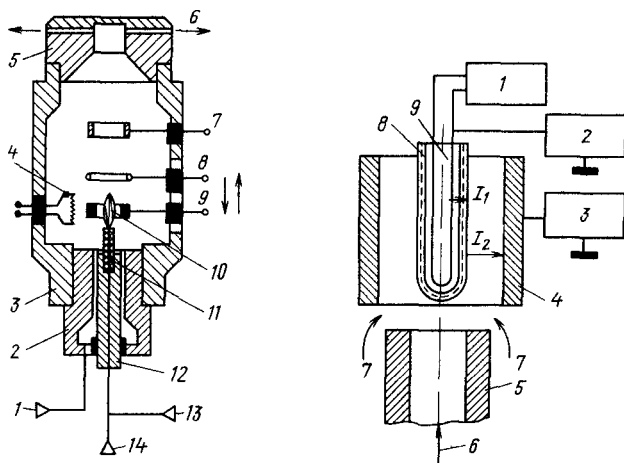


Рис. II.30. Конструкция ДТИ фирмы «Carlo Erba» (Италия):

1 — вход воздуха, 2 — основание, 3 — корпус, 4 — спираль поджига, 5 — крышка, 6 — выход газов, 7 — кольцевой измерительный электрод, 8, 9 — настраиваемые по высоте потенциальный электрод и держатель таблетки соли, 10 — пламя, 11 — горелка, 12 — держатель горелки, 13 — вход водорода, 14 — вход газа-носителя

Рис. II.31. Схема расположения электродов в ДТИ с тремя режимами работы:

1 — стабилизатор температуры, 2 — блок питания, 3 — усилитель, 4 — корпус, 5 — выход из колонки, 6 — вход газа-носителя, 7 — дополнительные газы, 8 — керамический источник, 9 — корпус источника ионов,  $I_1$  — ток миграции зарядов через тело источника ионов,  $I_2$  — ток, ведущий к потере зарядов с поверхности источника ионов

функциональные группы, такие как  $\text{NO}_2$ . Термоионный источник для второго режима работы ДТИ имеет низкую концентрацию атомов Cs в керамической основе, используется в атмосфере воздуха с небольшим количеством  $\text{H}_2$  и обладает селективностью к веществам, содержащим N и P. Каталитический источник изготовлен из керамической основы, содержащей Ni, работает в атмосфере воздуха и  $\text{H}_2$  и имеет универсальные показания ко всем органическим веществам с некоторым увеличением для гетероатомных соединений. Детектор использовали для анализов сточных вод при экстракции их метанолом.

Фирма «Hewlett — Packard» (США) применяет ДТИ, который также может работать в пламенном и беспламенном режимах. Конструкция детектора приведена на рис. II.33. Бусинка 5 с солью  $\text{Rb}_2\text{SO}_4$  и запрессованной платиновой спиралью с помощью точечной сварки соединяется с двумя электродами 4 и 9 и представляет собой вместе с ними неразъемную конструкцию. Запасные электроды хранятся в пробирках, при этом исключена возможность порчи бусинки.

Преимущество ДТИ с одной горелкой состоит в том, что его можно легко изготовить из обычного пламенно-ионизационного детектора, введя лишь незначительные изменения и не меняя всех остальных деталей.



Кармен в 1970 г. предложил ДТИ с двумя помещаемыми одна над другой горелками и разделенными платиновой сеткой с нанесенной на нее солью или гидроксидом щелочного металла. Такой детектор представляет собой, по существу, комбинацию двух независимых детекторов: ДПИ (нижний) и ДТИ (верхний). Электрические сигналы каждого пламени записываются на отдельных регистраторах. Продукты сгорания пробы (в нижней горелке ДПИ) способствуют испарению щелочного металла с поверхности платиновой сетки, на которую нанесены соединения щелочных металлов. Испаряющиеся соединения щелочных металлов попадают на верхний электрод и там ионизируются. Недостатком такого детектора является уже отмечавшееся постепенное уменьшение чувствительности по мере расходования соли щелочного металла, что вызывает необходимость частой

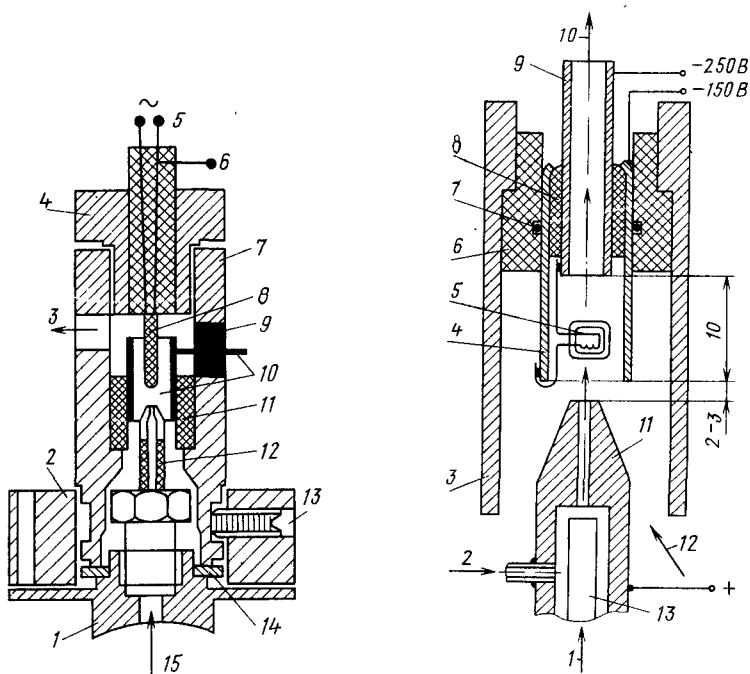


Рис. 11.32. Схема устройства ДТИ фирмы «Patterson» (США) для беспламенного режима работы:

1 — основание; 2 — монтажный фланец; 3 — выход газов; 4 — сменный источник соли; 5 — контакты нагревателя; 6 — проводник для подачи дополнительного потенциала; 7 — корпус; 8 — корпус источника ионов; 9 — изолятор; 10 — коллектор; 11 — керамический изолятор; 12 — горелка; 13 — винт крепления детектора; 14 — алюминиевая прокладка; 15 — вход газов

Рис. 11.33. Конструкция ДТИ фирмы «Hewlett — Packard» (США):

1 — вход газа-носителя; 2 — вход водорода; 3 — корпус детектора; 4 — центральный электрод; 5 — бусинка с солью и нагревателем; 6, 8 — изоляторы; 7 — уплотнение; 9 — измерительный электрод; 10 — выход газов; 11 — сопло и потенциальный электрод; 12 — вход воздуха; 13 — колонка

регенерации и уточнения калибровочных характеристик детектора. Достоинством двухпламенной системы детектирования является почти полная нечувствительность детектора к органическим соединениям, не содержащим фосфор и галогены, так как эти соединения сжигаются в нижнем пламени. Было показано, что сетка, помещаемая между двумя горелками, играет роль лишь носителя соли щелочного металла, поскольку применение сеток из различных материалов и с разным размером ячеек практически не влияло на чувствительность детектора. Платина в этом случае предпочтительна ввиду ее большей химической стойкости.

Для пламенного ДТИ увеличение фонового тока детектора приводит к увеличению полезного сигнала. Фоновый ток детектора в свою очередь зависит от температуры соли щелочного металла, помещаемой в пламя или около него. Температура соли непосредственно зависит от температуры пламени. Температура и размер пламени, как было показано еще при изучении ДПИ, зависят от расхода водорода. При изменении расхода газа-носителя (обычно азота) меняется состав пламени (отношение азота к водороду) и, следовательно, его температура. Однако это влияние менее значительно, чем влияние изменения расхода водорода. Превышение расхода водорода наряду с увеличением чувствительности приводит к значительному увеличению уровня шумов, причем реальная чувствительность детектора значительно уменьшается. Попытки уменьшения уровня шумов за счет снижения расхода водорода (например, с 30 до 18 мл/мин), приводят к снижению ионизационной эффективности детектора.

Увеличение расхода  $H_2$  приводит к увеличению фонового тока и чувствительности к фосфор- и азотсодержащим соединениям по сравнению с чувствительностью к углеводородам, однако при этом увеличивается шум и дрейф, связанный со скоростью испарения соли. Поэтому необходимо устанавливать такой расход  $H_2$ , чтобы получить оптимальные показания ДТИ с солевым резервуаром, обогреваемым пламенем.

Поступающие в детектор газы (азот и воздух) имеют более низкую, чем пламя, температуру, поэтому изменение расхода газа-носителя и воздуха также может оказывать влияние на показания детектора.

Поток воздуха должен быть таким, чтобы поддерживать процесс горения и продувать детектор для удаления продуктов сгорания. При низком расходе воздуха чувствительность детектора заметно уменьшается, так как сказывается недостаток кислорода. При расходе примерно  $200 \text{ см}^3/\text{мин}$  и выше влияние изменения расхода воздуха на чувствительность детектора невелико. При очень высоком расходе воздуха (больше  $500 \text{ см}^3/\text{мин}$ ) реальная чувствительность детектора уменьшается, по-видимому, за счет охлаждения соли большими массами входящего более холодного воздуха и увеличения уровня шумов за счет большей турбулент-

ности потока. Измерение расхода газов (особенно водорода) с высокой точностью является сложной задачей. Однако в связи с тем что изменение расхода газов приводит к изменению фонового тока детектора, который для ДТИ значительно больше, чем для большинства других ионизационных детекторов, фоновый ток термоионного детектора можно использовать как контрольный параметр режима его работы и для контроля постоянства расхода газов. Обычно при оптимальном режиме работы детектора устанавливают фоновый ток, который поддерживается затем постоянным с помощью регулирования расхода газов. При этом надо иметь в виду, что расход газа-носителя должен быть оптимальным и с точки зрения оптимума процесса хроматографического разделения в колонке.

Фоновый ток ДТИ, как правило, в 100 раз выше, чем других ионизационных детекторов и равен  $10^{-8}$ — $10^{-9}$  А. Важным параметром, влияющим на чувствительность ДТИ, является уровень шумов. Уровень шумов для ДТИ составляет  $10^{-10}$ — $10^{-11}$  А, т. е. примерно на порядок выше, чем для ДЭЗ и на два порядка выше, чем для ДПИ. Поэтому дальнейшее увеличение уровня шумов ДТИ приводит к значительному увеличению предела детектирования.

ДТИ применяют в основном для качественного и количественного анализа соединений, содержащих атомы Р, N, Cl, Br, I, часто с использованием показаний двух и более детекторов. ДТИ используют для газохроматографического анализа хлорированных и фосфорорганических пестицидов, инсектицидов и ряда биологически активных соединений. Так как ДТИ обладает наивысшей чувствительностью к фосфорсодержащим соединениям, наибольшее применение он нашел именно для анализа этих соединений. ДТИ был применен также для детектирования азотсодержащих соединений, причем подбор экспериментальных параметров позволил увеличить чувствительность детектора к этим соединениям на 2—3 порядка по сравнению с ДПИ.

При определенных условиях ДТИ становится чувствительным и к галогенсодержащим соединениям, причем чувствительность детектора к ним примерно в 100—600 раз ниже, чем к соединениям, содержащим фосфор, однако все же на порядок выше чувствительности ДПИ. Поверхностно-ионизационный детектор применяли также для высокочувствительного анализа хлоридов металлов. Чувствительность детектора (например, для  $\text{SiCl}_4$  и  $\text{SnCl}_4$ — $1 \cdot 10^{-10}$  г/с) на четыре порядка выше чувствительности ДТП к этим же соединениям. С помощью такого детектора можно определять неорганические хлориды на уровне  $10^{-5}\%$ .

Показано, что пламенный ДТИ с источником ионов щелочного металла в виде монокристалла КВг, закрепленным на конце керамической горелки ДПИ, может детектировать I-, Br- и Cl-содержащие соединения. Для анализа хлорбензола при температуре

детектора 180—190°C и фоновом токе  $1-2 \cdot 10^{-9}$  А оптимальные расходы азота, водорода и воздуха составляли 20, 90 и 700—800 см<sup>3</sup>/мин соответственно. Селективность в этих условиях к ди- и триэтиловым эфирам фосфорной кислоты составляла 4800 и 4000 по сравнению с показаниями ДПИ. На ДТИ с КВг проведено определение трихлорэтилена в подземной воде после отгонки легких фракций и концентрирования на сорбенте Тенакс АГ при пределе детектирования 0,19 нг и уровне шумов  $5,5 \cdot 10^{-11}$  А.

## Глава 5

### ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ УСТРОЙСТВА

Для упрощения и ускорения анализа или расширения возможностей газовой хроматографии применяют специальные устройства, которые прилагаются к хроматографу в виде отдельных блоков. К таким устройствам относят приставки, обеспечивающие переключение колонок и потока газа-носителя, программирование его расхода, применение паровых подвижных фаз. К устройствам, расширяющим возможности газовой хроматографии, относят пиролитические приставки, позволяющие исследовать нелетучие объекты методом газовой хроматографии, а также системы концентрирования и извлечения летучих продуктов из пробы.

#### 5.1. СХЕМЫ ОБРАТНОЙ ПРОДУВКИ И ПЕРЕКЛЮЧЕНИЯ КОЛОНОК

Обычно при хроматографическом разделении проба вместе с потоком газа-носителя проходит испаритель, колонку и детектор. В сложных случаях разделения требуется переключение колонок и соответственно изменение направления потока газа-носителя. Систему переключения колонок и изменения направления газа-носителя рассмотрим на примере системы хроматографических блоков СХБ-1, разработанной СКБ ИОХ АН СССР [10]. Эта система состоит из трех блоков: переключения колонок, создания потока парового элюента и программирования расхода элюента. Первый блок обеспечивает разделение в режимах обратной, полуобратной, последовательной и параллельной продувки колонок.

**Обратная продувка.** Обратную продувку применяют в тех случаях, когда анализируемая смесь содержит легкие компоненты, содержание которых необходимо определить по отдельности, и тяжелые компоненты, концентрации которых достаточно измерить в сумме. В этом случае после регистрации легких компонентов детектором целесообразно переключить направление по-

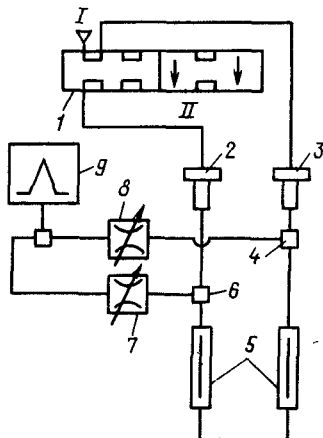


Рис. II.34. Схема обратной продувки:

1 — переключающий потоки кран, 2, 3 — испарители, 4, 6 — переходники, 5 — колонка, 7, 8 — дроссели, 9 — детектор

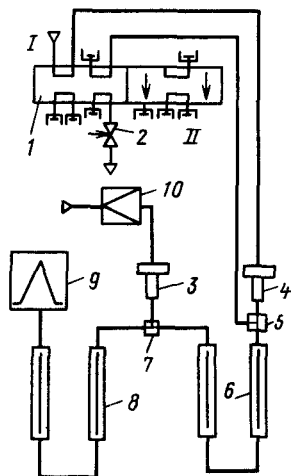


Рис. II.35. Схема полуобратной продувки:

1 — переключающий потоки кран, 2 — вентиль, 3, 4 — испарители, 5, 7 — переходники, 6, 8 — колонки, 9 — детектор, 10 — регулятор давления

тока через колонку на обратное и выдуть тяжелые компоненты в детектор для регистрации их суммарного пика.

Схема обратной продувки приведена на рис. II.34. Перед началом работы кран 1 ставят в положение I, изображенное на схеме, при этом газ-носитель, пройдя испаритель 2, разделяется в переходнике 4 на два потока (пневмосопротивление дросселей 7 и 8 подбирается близким к пневмосопротивлению колонки). Большая часть газа-носителя поступает в детектор через дроссель 8, а меньшая часть — через колонку 5 и дроссель 7. Кроме того, небольшой поток газа (на схеме не показан) подается в испаритель 2 для предотвращения диффузии анализируемых компонентов из переходника 6 в испаритель 2 и далее в газовые коммуникации. После дозирования разделяемой смеси в испаритель 3, большая часть через дроссель 7 сразу поступит в детектор и зафиксируется в виде суммарного пика, а меньшая часть поступит в колонку. После того как легкие целевые компоненты будут зарегистрированы детектором, кран 1 переключают в положение II. Теперь газ поступает через испаритель 2 в переходник 6, продувая колонку в обратном направлении. Если сопротивление дросселей равно сопротивлению колонки, то после переключения крана 1 нулевая линия детектора восстанавливается.

**Полуобратная продувка.** Метод полуобратной продувки заключается в том, что после элюирования в прямом направле-

нии и перехода части компонентов из первой секции колонки во вторую газ-носитель подают между двумя секциями колонки, при этом в одной из них продолжается элюирование в прямом направлении, а в другой происходит обратная продувка и тяжелые компоненты выдуваются в атмосферу. Метод позволяет отделить компоненты, пики которых могли бы наложиться на пики определяемых компонентов или нарушить систему детектирования. Он значительно экономит время анализа, поскольку в этом случае обратная продувка протекает почти одновременно с прямым элюированием. Метод рекомендуется применять при анализе примесей, элюируемых перед основным компонентом (растворителем): после перехода примесей во вторую секцию включают полуобратную продувку, при этом примеси элюируются в сторону детектора, а основной компонент в обратном направлении.

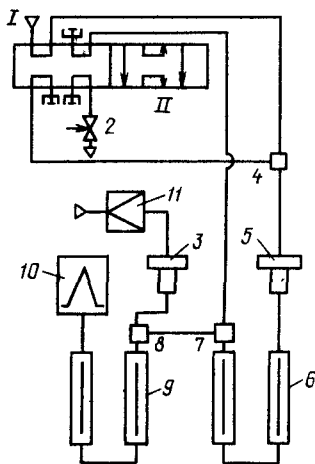
Схема соединения элементов СХБ-1 при осуществлении полуобратной продувки изображена на рис. II.35. Кран 1 сначала ставят в положение I, при этом поток газа течет через испаритель 4 и колонки 6 и 8, соединенные последовательно. Небольшой дополнительный поток газа, натекающий в испаритель 3, препятствует диффузии в него компонентов из переходника 7. После ввода разделяемой смеси в испаритель 4 и перехода целевых компонентов из колонки 6 в колонку 8 кран 1 переключают в положение II. После этого основной поток газа-носителя начинает поступать через испаритель 3, элюируя целевые компоненты через колонку 8 в детектор, а тяжелые компоненты из колонки 6 в обратном направлении. Поток через колонку 8 в результате переключения не изменится, поскольку давление в переходнике 7 благодаря регулятору давления 10 остается на прежнем уровне. Обратный поток через колонку 6 можно отрегулировать вентилем 2.

**Последовательная и параллельная продувка.** Этот метод заключается в том, что сначала разделяемая смесь элюирует через две последовательно соединенные колонки, но после перепуска слабо удерживаемых компонентов во вторую из них обе колонки начинают продувать газом-носителем параллельно. Причем газ из второй колонки направляют в детектор, а из первой чаще всего в атмосферу. Метод последовательной и параллельной продувки целесообразно применять в тех же случаях, что и метод полуобратной продувки, если выводимые из системы неопределяемые компоненты удерживаются недостаточно сильно. В этом случае нет смысла выдувать их в обратном направлении, а с точки зрения экономии времени лучше выдуть в прямом.

Схема соединения элементов блока СХБ-1 при проведении последовательной и параллельной продувки показана на рис. II.36. При положении I крана 1 поток газа течет через обе последовательно соединенные колонки 6 и 9, кроме того, небольшой поток

Рис. II.36. Схема последовательной и параллельной продувки:

1 — переключающий потоки кран; 2 — вентиль; 3—5 — испарители; 6, 9 — колонки; 7, 8 — переходники; 10 — детектор; 11 — регулятор давления



газа поступает через испаритель 3 для предотвращения диффузии компонентов. Анализируемую смесь вводят через испаритель 5, после перехода слабо удерживаемых компонентов в колонку 9 кран 1 переводят в положение II и открывают вентиль 2. При этом колонка 6 продувается потоком газа от крана 1, а колонка 9 от отдельного редуктора 11. Сохранение в переходнике 8 неизменного давления, задаваемого этим редуктором, позволяет поддерживать прежний расход газа через колонку 9. Скорость потока через колонки 6 и 9 должна устанавливаться с помощью вентиля 2 одинаковой, тогда пневмосопротивления этого вентиля и колонки 9 оказываются одинаковыми, а участок 7—8 становится пневмозатвором, препятствующим перетечке газа с содержащимися в нем компонентами пробы из колонки 6 в колонку 9. Эффективность пневмозатвора следует проверить предварительными холостыми опытами, вводя после переключения крана 1 в колонку 6 слабосорбирующиеся вещества. Отсутствие регистрации пиков этих веществ свидетельствует об эффективности пневмозатвора. В противном случае необходимо регулятором давления 11 подобрать давление, исключающее проскок.

Кроме описанного выше переключения потока газа блок СХБ-1 позволяет проводить разделение при программировании расхода и в потоке паровых элюентов [47]. Программирование расхода газа-носителя имеет преимущества по сравнению с программированием температуры, хотя цели этих процессов одинаковы. Можно показать, что унос неподвижной фазы в этом случае меньше, кроме того, не происходит снижения ее селективности, вызванного повышением температуры. Поскольку весь анализ проводят в условиях относительно низкой температуры, можно применять менее термостойкие неподвижные фазы и разделять

относительно термолabile соединения. Объемы удерживания при программировании расхода имеют те же значения, что и в изохорическом режиме, что облегчает интерпретацию хроматограмм. Наконец, время возвращения на первоначальный режим после завершения программы осуществляется значительно быстрее, чем при программировании температуры. Имеются и недостатки метода: менее значительное сокращение времени анализа, чем при программировании температуры и более сложная процедура подбора режима программирования.

При проведении хроматографического разделения в потоке паровых элюентов удается успешно разделять сильнополярные и малолетучие вещества, анализ которых затруднен при использовании обычных газов-носителей. Наиболее часто в качестве парообразующего агента применяют воду, хотя описано использование и других веществ, таких как сероуглерод, муравьиная кислота и др. [48].

Паровые подвижные фазы адсорбируются на активных центрах твердых носителей и, блокируя их, существенно улучшают симметрию пиков полярных веществ. Растворяясь в неподвижной фазе, они могут изменять ее полярность и улучшать разделение некоторых пар веществ. В парах воды становится возможным использование многих активных адсорбентов, например силикагелей, для разделения относительно высококипящих и полярных веществ, при этом резко расширяется температурный диапазон применения газовой хроматографии, ограниченный летучестью неподвижной фазы, а также проявляются интересные разделительные эффекты, например выход из колонки этанола раньше, чем метанола. В парах воды облегчается анализ водных растворов и конденсация веществ в условиях препаративной хроматографии.

В целом все описанные дополнительные устройства существенно расширяют возможности газовой хроматографии.

## 5.2. ПИРОЛИТИЧЕСКИЕ ПРИСТАВКИ

Пиролитическая газовая хроматография (ПГХ) представляет собой метод анализа нелетучих соединений и сложных нелетучих объектов, состоящих из большого числа соединений, по продуктам их термического разложения [49]. С помощью ПГХ можно, в частности, различать сложные объекты (различные образцы древесины, бумаги, классы микроорганизмов и т. д.), не вдаваясь в их детальный химический состав. Анализ этим методом осуществляют на обычной хроматографической аппаратуре, а пироллиз объектов проводят в специальной пиролитической ячейке (ПЯ), прилагаемой к прибору в составе пиролитической приставки (ПП). Последняя, кроме ПЯ, включает обычно блок питания.



Метод ПГХ обладает высокой чувствительностью (навески анализируемой пробы составляют обычно не более миллиграмма) и экспрессностью, присущих вообще хроматографическим методам анализа. Основное его ограничение — низкая воспроизводимость, особенно межлабораторная, что не позволяет составить, например, каталоги пирогамм и использовать их для идентификации объектов. Как правило, накопление пирогамм приходится проводить каждой лаборатории, да еще применительно к конкретной ячейке, поскольку даже ячейки одного типа часто обладают индивидуальными особенностями.

К ПЯ предъявляют следующие требования: воспроизводимость температурного режима пиролиза и быстрый выход на заданную температуру с тем, чтобы именно при этой температуре происходило термическое разложение вещества; отсутствие вторичных реакций, протекающих в газовой фазе между продуктами пиролиза (считается, что вещества, образующиеся в результате этих реакций, менее специфичны и не характеризуют в полной мере состав исходного материала).

Все ПЯ можно разделить на две большие группы: статические (закрытые) и динамические (проточные). Первые представляют собой замкнутый объем, в котором исследуемый материал нагревается, после чего продукты пиролиза вводятся в хроматограф. В таких ПЯ продукты пиролиза длительное время находятся при высоких температурах и могут вступить между собой в химические реакции. Ячейки статического типа промышленностью не выпускаются.

В динамических ПЯ образец быстро нагревают в потоке газа-носителя, который удаляет образующиеся вещества из зоны пиролиза. В результате в значительной мере подавляются вторичные реакции, однако сохраняется и даже усиливается другой недостаток — трудность добиться хорошей воспроизводимости температурного режима. По принципу нагрева пиролизуемого материала динамические ПЯ можно разделить на два основных типа. В ячейках первого типа пиролиз вызывается термоэлементом, а стенки пиролизной камеры имеют температуру значительно ниже температуры этого элемента, обычно она не превышает температуры хроматографической колонки. ПЯ второго типа представляют собой трубчатые печи, стенки которых нагреты до температуры пиролиза. По способу нагрева ПЯ первого типа в свою очередь подразделяют на филаментные и индукционные: в первых электрический ток пропускают во время пиролиза через термоэлемент, а во вторых термоэлементы, изготовленные из ферромагнитных материалов, нагреваются токами высокой частоты. Таким образом, промышленностью выпускаются ячейки трех типов: филаментные, индукционные и печного типа.

ПЯ первого типа состоят из корпуса, в который вставлена

сменная кварцевая трубка; внутри последней расположен термоэлемент, выполненный в виде спирали из нихромовой проволоки. Анализируемую пробу помещают на спираль и вводят в ПЯ, после чего на спираль подается напряжение от источника питания. Последний обычно состоит из мощного стабилизатора напряжения, реле времени и устройства импульсного разогрева термоэлемента. Для импульсного разогрева служит конденсатор, предварительно заряжаемый через стабилизированный преобразователь напряжения. По команде с реле времени конденсатор разряжается на термоэлемент, разогревая его до  $1000^{\circ}\text{C}$  примерно за 25 мс. После этого с помощью стабилизатора напряжения на термоэлемент в течение задаваемого времени подается постоянный по силе ток, необходимый для поддержания температуры пиролиза на нужном уровне.

В пиролизере индукционного типа внутри металлического корпуса размещена индукционная катушка, вдоль оси которой установлена сменная кварцевая трубка. Внутри этой трубки находится термоэлемент из ферромагнитного материала, на который помещают исследуемый образец. Термоэлементы выполняются в двух формах, для жидких и твердых образцов, из сплавов железа и никеля различного состава. Источник питания ПЯ индукционного нагрева включает высокочастотный генератор напряжения и реле времени. После нанесения исследуемого материала на термоэлемент последний вводится в кварцевую трубку. При возбуждении вокруг трубки высокочастотного электромагнитного поля температура термоэлемента быстро возрастает до точки Кюри данного материала. Для изменения температуры пиролиза необходимо использовать термоэлемент из сплава другого состава, набор таких термоэлементов прилагается к ПЯ и обеспечивает варьирование температуры пиролиза от  $400$  до  $1000^{\circ}\text{C}$ . Как видно из приведенного описания, ячейка filamentного типа отличается простотой устройства, малым объемом, высокой скоростью нагрева до заданной температуры, простотой очистки термоэлемента от нелетучих продуктов пиролиза. Недостатком ячеек filamentного типа является не всегда удовлетворительная воспроизводимость температурного режима, особенно на разных ячейках даже одинаковой конструкции, изменение сопротивления нити в процессе эксплуатации.

Преимуществами ПЯ индукционного нагрева являются: точно устанавливаемая и воспроизводимая температура нагревательного элемента, малый мертвый объем. К недостаткам следует отнести возможность работы лишь при строго фиксированных температурах и относительную трудность в нанесении воспроизводимых количеств анализируемого материала. Практически невозможно исследовать образцы нерастворимые и не суспендируемые. Сгибание проволоки с целью размещения на нагревательном элементе таких образцов увеличивает время разогрева и сво-

дит на нет преимущества ячейки этого типа. Необходимо также учитывать, что различные участки проволоки в зависимости от их расположения в высокочастотной катушке разогреваются с различной скоростью, кроме того, истинная температура пиролиза образца может быть ниже точки Кюри, поскольку вблизи этой точки время нагрева возрастает. Поэтому, хотя некоторые авторы считают, что на индукционных ПЯ получаются наиболее воспроизводимые результаты, детальные исследования показали, что межлабораторная невоспроизводимость хроматограмм не отличает их от ячеек других типов. Вероятно, вследствие этого зарубежные фирмы прекратили выпуск ПЯ индукционного нагрева и выпускают только ПЯ филаментного типа.

Фирма «Вариан», выпускающая ПП Пиропроб, указывает на быстроту нагрева филаментного термоэлемента до заданной температуры: в ПП «Пиропроб», модель 190 термоэлемент может быть нагрет до 600 °C за 10 мс, а до 1000 °C за 17 мс, в то время как ПЯ индукционного нагрева выходила на заданный температурный режим за 100—300 мс. Ячейка «Пиропроб» устроена очень просто. Она состоит из держателя, к которому прикреплены платиновые нагревательные элементы. После нанесения образца термоэлемент может быть прогрет до относительно низкой температуры с целью удаления растворителя, после чего держатель с термоэлементом вводится в испаритель хроматографа через отверстие, обычно закрываемое резиновой мембраной. Для хроматографов фирмы «Вариан» предусмотрена также особая камера, которая навинчивается на это отверстие и в которую вводится держатель ячейки. Камера может нагреваться до 500 °C и предохраняет испаритель хроматографа от попадания в него малолетучих продуктов пиролиза. После введения держателя в систему хроматографа, последняя герметизируется, поток газа-носителя и нулевая линия восстанавливаются и от силового блока подаются напряжение на термоэлемент.

Ячейка печного типа представляет собой трубчатую печь-реактор из кварцевого стекла, которая нагревается предварительно и внутрь которой в кварцевой лодочке, не прерывая потока газа-носителя, вводится навеска анализируемого материала. Лодочка крепится в специальном съемном держателе и перемещается с помощью штока, который служит для подвода газа-носителя и герметизации канала ввода пробы. После проведения пиролиза остатки пробы дожигают на воздухе в печи сгорания, расположенной рядом с печью пиролиза. Регулятор температуры пропорционального типа позволяет задавать температуру пиролиза от 100 до 1000 °C с дискретностью 5 °C. Ячейка удобна в эксплуатации, обеспечивает возможность работы как с малыми, так и с большими пробами, которые можно анализировать непосредственно в твердом состоянии. Недостатки ячейки — относительно большой объем, возможность протекания вторичных реакций.

## ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

### 6.1. МЕТОДЫ ПОДГОТОВКИ ПРОБ ДЛЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

При определении микропримесей в объектах окружающей среды, продуктах питания особое значение приобретает максимальное увеличение чувствительности хроматографического метода, которое может быть достигнуто за счет оптимизации параметров разделения и детектирования, проведения реакций дериватизации с последующим использованием селективных методов детектирования, создания новых высокочувствительных детектирующих систем и концентрирования примесей на сорбенте или в охлажденной ловушке с последующей тепловой десорбцией. Первый метод обычно дает увеличение чувствительности не более чем в 10 раз, второй не обладает требуемой воспроизводимостью и имеет высокую погрешность при количественном анализе, для осуществления третьего требуется проведение специальных исследований, кроме того, он достаточно трудоемок и не всегда приводит к положительным результатам.

Рассмотрим подробнее методы получения производных с целью повышения чувствительности ГХ анализа, в том числе получение летучих производных для высококипящих или лабильных соединений, для которых метод ГХ вообще непригоден без перевода их в более летучие производные с проведением химических реакций в «мягких» условиях. Метод получения производных для повышения чувствительности различных типов детекторов, главным образом таких селективных детекторов, как ДЭЗ, ДТИ и ДПФ, состоит в введении с помощью химических реакций в молекулы анализируемых веществ различных функциональных групп и атомов, к которым используемый детектор имеет максимальную чувствительность. Например, ДЭЗ имеет повышенную чувствительность к галогенам. Поэтому получение и анализ галогенсодержащих производных органических соединений путем замены атомов H на атомы Cl, Br, F и I является перспективным путем повышения чувствительности этого детектора. Получение азот- и фосфорсодержащих производных позволяет увеличить чувствительность анализа с применением ДТИ, а получение фосфор- и серосодержащих производных снижает предел обнаружения ГХ-метода с использованием ДПФ. В табл. 2.13 приведены сравнительные показания ДЭЗ для некоторых галогенпроизводных спиртов и фенолов. Бром и иод не входят в состав этих производных в связи с их малой летучестью и значительно меньшей эффективностью разделения. Из табл. 11.13 видно, что с увели-

Таблица II 13. Показания ДЭЗ для некоторых производных спиртов и фенолов

Производное	Соединение		
	тимол	холестерол	тостестерон
Монофторацетил	0,007	—	—
Монохлорацетил	0,3	—	0,2
Хлордифторацетил	—	2,08	1,41
Трифторацетил	—	0,09	0,01
Пентафторпропионил	1,3	—	0,28
Гептафторбутирил	1,0	1,00	1,00
Дигептафторбутирил	—	—	2,30
Перфтороктаноил	—	1,85	2,10
Пентафторбензоил	6,9	—	—
Пентафторбензил	5,9	—	—

чением молекулярной массы производных чувствительность ДЭЗ в общем случае увеличивается.

Примером получения производных с целью повышения летучести анализируемых соединений может служить метод газохроматографического анализа биологических проб на содержание летучих производных высших жирных кислот и оксикислот, содержащих от 10 до 26 углеродных атомов в молекуле при пределе детектирования по метилпальмитату  $10^{-6}$  г/мл пробы и воспроизводимости анализа 2—3% при доверительной вероятности 0,95. Метод основан на переводе жирных кислот в метиловые эфиры и переводе метиловых эфиров оксикислот в их ацетильные производные. Анализ состоит из этапов щелочного гидролиза природных эфиров, экстракции и метилирования жирных кислот в растворе с метанолом при 85 °С в течение 5—10 мин, ацетилирования метиловых эфиров оксикислот, газохроматографического анализа летучих производных жирных кислот и оксикислот с использованием ДИП, программирования температуры и кварцевой капиллярной колонки с метилсилоксановой НФ. На рис. II.37 приведена хроматограмма метиловых эфиров жирных кислот  $C_{12}$ — $C_{18}$ , полученная на хроматографе «Кристалл-2000». Запись и обработка результатов проводилась с использованием мини-ЭВМ типа ДВК-ЗМ.

Одной из основных причин применения дериватизации в ГХ является перевод нелетучих соединений в более летучие. Особое место здесь занимают методы получения летучих производных аминокислот, которые в натуральном виде не только нелетучи, но и термически нестойки и поэтому их прямой анализ методом ГХ невозможен. В то же время актуальность задач качественного и количественного определения аминокислот в биологии, биохимии, медицине и микробиологии стимулирует развитие методов получения и анализа летучих производных аминокислот. Использование метиловых эфиров N-трифторацетил-производных

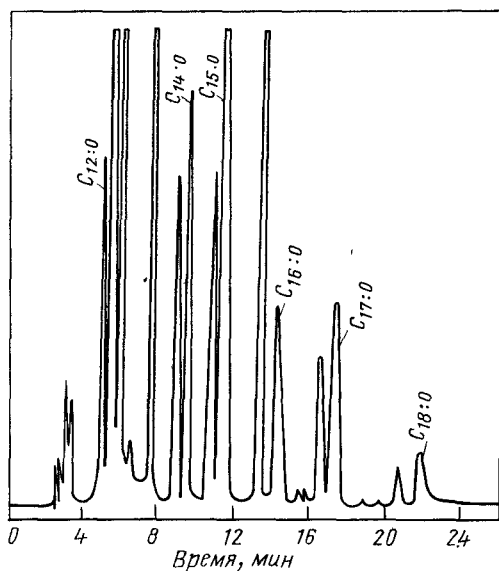


Рис. П.37. Хроматограмма метиловых эфиров жирных кислот  $C_{12}$ — $C_{18}$ , полученная на хроматографе «Кристалл-2000». Капиллярная колонка 11 м·200 мкм, НФ — OV-1; детектор — ДПИ, объем пробы — 5 мкл. Программирование температуры от 150 (1 мин) до 250 °С (1 мин) со скоростью 5 °С/мин, температуры испарителя и детектора 250 °С. Расход азота-1 — 30 см<sup>3</sup>/мин, азота-2 — 30 см<sup>3</sup>/мин, водорода 30 см<sup>3</sup>/мин, воздуха 300 см<sup>3</sup>/мин. Входное давление — 0,06 МПа, деление потоков — 1 : 50, расход газа-носителя 0,6 см<sup>3</sup>/мин

изучено наиболее полно. Триметилсилильные производные аминокислот представляют интерес с точки зрения одноступенчатой процедуры получения производных по сравнению с большинством других двух- и трехступенчатых методов. Летучими производными аминокислот обычно являются амины, альдегиды, нитрилы, дикетопиперазины, оксазолы, фенилтиогидантены, метилтиогидантены, морфолы, гидроксикислоты, метиловые эфиры  $\alpha$ -хлоркислот, аминокислоты, метиловые, этиловые, *n*-пропиловые, *n*-бутиловые, *n*-амиловые, триметилсилильные эфиры и смешанные производные, например трифторацетил — метил-, бензилокси-карбонилметил- и др.

## 6.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИМЕСЕЙ

Если какие-либо из определяемых компонентов присутствуют в смеси в малых количествах, то их концентрация в потоке газа-носителя после колонки может оказаться недостаточной для фиксирования детектором или точного измерения параметров пиков. Простейшим приемом при анализе примесей является

дозирование в колонку больших объемов разделяемой смеси, однако этот прием имеет ограничения. Во-первых, как уже указывалось в разд. 2.4.8, дозирование больших объемов ухудшает эффективность и пики могут плохо разделяться. При этом уширяться будут все пики, в том числе и пики примесей, поскольку при объемной перегрузке имеет значение объем всей пробы  $V_p$ , а не парциальный объем данного компонента, как это иногда ошибочно считают. Во-вторых, концентрация основного компонента при вводе больших проб также оказывается значительной и его пик получается несимметричным. Причины этого рассмотрены не будут, отметим только, что, как правило, если температура анализа не слишком низкая (не более чем на 50—100 °С ниже температуры кипения), формируется пик с размытым задним фронтом. Пики примесей, выходящие из колонки после основного компонента, перекрываются этим фронтом, их трудно обнаружить на хроматограмме и измерить достаточно точно. Поэтому стараются подобрать сорбент таким образом, чтобы пики примесей выходили перед основным компонентом, хотя это удается далеко не во всех случаях. Наконец, как уже отмечалось, имеется предел увеличения высоты пика с ростом объема пробы, после чего дальнейшее увеличение этого объема становится бесслесленным.

Если чувствительности хроматографа оказывается недостаточно для непосредственного анализа смеси, прибегают к методам концентрирования. Рассмотрим основные из этих методов.

### 6.2.1. Адсорбционное концентрирование

Адсорбционное концентрирование применяют наиболее часто, особенно для накопления примесей, содержащихся в слабосорбирующихся газах или жидкостях. Довольно типичный пример — анализ атмосферного воздуха на содержание в нем токсичных веществ. В этом случае анализируемый газ пропускают через короткую трубку с сорбентом, находящуюся при относительно низкой температуре (комнатной или ниже), при этом примеси адсорбируются, а значительная часть основного компонента сбрасывается. Затем концентратор подсоединяют ко входу газового хроматографа, устанавливают поток газа-носителя и концентратор нагревают до температуры, допустимой с точки зрения термостабильности сорбента и анализируемых веществ. В результате анализируемые вещества вводят в хроматограф при концентрации значительно более высокой, чем в исходной смеси.

Покажем это с помощью несложных расчетов. Пусть анализируемая смесь, например воздух, содержащая интересующую нас примесь с концентрацией  $C_n$ , подается в концентратор с сорбентом. По мере подачи воздуха сорбент насыщается примесью и фронт насыщенного сорбента перемещается вдоль его слоя.

За счет диффузионно-кинетических факторов этот фронт размывается, для упрощения расчетов пренебрежем этим размыванием и будем считать фронт отвесным. Воздух, освобожденный от примеси, будет выходить из концентратора, а примесь накапливаться в нем. Когда фронт достигнет конца концентратора, наступит проскок примеси, и она вновь появится в выходящем из концентратора воздухе, а дальнейшее ее накопление в концентраторе, естественно, прекратится. В газовую фазу концентратора все время поступает исходная смесь с концентрацией  $C_n$ , эта концентрация сохранится здесь и после проскока. Количество примеси, накопленное в концентраторе будет равно

$$V_{\text{кол}} a_n = S_{\text{кол}} L a_n = S_{\text{кол}} L C_n \Gamma_n,$$

где  $S_{\text{кол}}$  — сечение и длина концентратора;  $\Gamma_n$  — общий коэффициент Генри при температуре адсорбции.

Если теперь быстро увеличить температуру концентратора, то коэффициент Генри уменьшится до величины  $\Gamma_k$ , часть вещества перейдет с сорбента в газовую фазу и концентрация в ней увеличится до величины  $C_k$ . Поскольку при этом  $S_{\text{кол}}$  и  $L$  останутся прежними, для выполнения требований материального баланса (сохранения общего количества вещества) необходимо, чтобы  $C_n \Gamma_n = C_k \Gamma_k$ . Отсюда получаем простое выражение для степени обогащения  $O$ :

$$O = C_k / C_n = \Gamma_n / \Gamma_k.$$

Концентрация  $C_k$ , сформировавшаяся в газовой фазе, будет сохранена в концентраторе и хроматографической колонке и сможет быть зафиксирована детектором. Из этой формулы видно, что степень обогащения определяется исключительно отношением коэффициентов Генри при температурах адсорбции и десорбции. Коэффициент Генри равен:

$$\Gamma = \Gamma_0 \exp (Q/RT),$$

где  $\Gamma_0$  — константа, в первом приближении не зависящая от температуры;  $Q$  — теплота сорбции;  $R$  — газовая постоянная.

Если записать эти выражения для  $\Gamma$  при температурах сорбции и десорбции и взять их отношение, получим

$$O = \exp [Q/R (T_n - T_k) / (T_n T_k)].$$

Отсюда видно, что для получения максимального обогащения необходимо уменьшать температуру адсорбции, увеличивать температуру десорбции и иметь сорбенты с большой теплотой сорбции по анализируемым примесям. Чаще всего примеси из воздуха адсорбируют при комнатной температуре, только в случае анализа постоянных газов используют пониженные температуры вплоть до температуры жидкого азота. Температура десорбции определяется термостабильностью сорбентов. Конечно, начиная с определенного предела, сорбция вещества может оказаться



настолько слабой, что дальнейший рост температуры станет бессмысленным.

Остановимся кратко на основных параметрах концентрирования и методах их оценки с целью подбора сорбента и условий, наиболее пригодных для концентрирования данной примеси. Один из таких параметров — степень обогащения  $O$  — уже рассматривался выше. Поскольку объем удерживания  $V_m = V_{\text{кол}} \Gamma$ , то обогащение

$$O = \Gamma_n / \Gamma_k = V_{mn} / V_{mk},$$

где  $V_{mn}$ ,  $V_{mk}$  — объемы (или времена) удерживания примеси при температурах адсорбции и десорбции.

Вторая часть формулы показывает способ определения степени обогащения и соответственно подбора сорбента, обеспечивающего максимальное значение  $O$ : заполнив хроматографическую колонку испытуемым сорбентом, следует определить время удерживания при температуре адсорбции (обычно комнатная) и десорбции, и взять их отношение. При этом могут возникнуть трудности, связанные с тем, что при температуре адсорбции вещество будет удерживаться очень сильно и не фиксироваться на хроматограмме за приемлемое время, а при температуре десорбции, наоборот, элюировать из колонки очень быстро, так что точность измерения времени удерживания будет очень низкой. Рекомендуется поэтому в первом случае использовать как можно более короткую колонку и высокий расход газа-носителя, а во втором случае — длинную колонку и низкий расход газа-носителя. Соответственно,  $O$  вычисляя по формуле:

$$O = (t_{mn} W_n L_k) / (L_n t_{mk} W_k).$$

Индексы  $n$  и  $k$  относятся к стадиям адсорбции и десорбции.

Если и эти очевидные приемы оказываются недостаточными, можно определить  $t_m$  при трех температурах, несколько превышающих температуру адсорбции (самая низкая — на  $20\text{--}25^\circ\text{C}$  выше этой температуры, две последующие — с интервалом  $15^\circ\text{C}$ ), после чего, пользуясь линейной зависимостью  $\lg t_R - 1/T$  найти экстраполяцией  $t_{Rn}$ , а затем и  $t_{mn}$  при температуре адсорбции. Аналогично проводят измерения при трех температурах ниже температуры десорбции, чтобы найти  $t_{mk}$ .

Описанные эксперименты позволяют подобрать сорбент, обеспечивающий достаточную степень концентрирования (обычно  $100\text{--}1000$ ), а также температуры адсорбции и десорбции. Из изложенного видно, что сорбент должен сильно поглощать примесь при температуре адсорбции ( $T_n$ ) и слабо при температуре десорбции ( $T_k$ ), именно сочетание этих свойств является определяющим для достижения высокого обогащения.

Объем пробы является вторым важным параметром концентрирования. Как уже указывалось в разд. 2.4.8, объем пробы, пода-

ваемый в колонку, должен быть достаточным для образования ступени, тогда концентрация в максимуме пика имеет наибольшее значение и равна концентрации в вводимой пробе. В колонну подается объем пробы  $V_k$  при концентрации  $C_k$ , при этом должен выполняться баланс

$$V_n C_n = V_k C_k,$$

откуда

$$V_n/V_k = C_k/C_n = \Gamma_n/\Gamma_k.$$

Согласно уравнению (1.66), для образования ступени необходимо соблюдение условия (индексы:  $n$  — начальный для колонки,  $k$  — конечный для концентратора)

$$V_k > 3\sqrt{N_0}V_s > 3V_R/\sqrt{N_0}.$$

Тогда для оценки необходимого объема пробы, подаваемой в концентратор, получаем неравенство

$$V_n = V_k (\Gamma_n/\Gamma_k) > 3(V_R/\sqrt{N_0})(\Gamma_n/\Gamma_k) > 3(V_R/\sqrt{N_0})O. \quad (11.3)$$

Для оценок по этой формуле необходимо определить по изложенной выше методике степень обогащения  $O$  и величины  $V_R$  и  $N_0$  для разделительной колонки.

Конечно, не во всех случаях следует добиваться образования ступени, учитывая, что с увеличением  $V_k$  разделение ухудшается; поэтому определенную по неравенству (11.3) величину можно уменьшить в 1,5—2,0 раза. Объем дозы перестает влиять на эффективность (перегрузка отсутствует) при значениях, меньших  $0,5 V_R/\sqrt{N_0}$ . Поэтому нижним пределом для  $V_n$  следует считать значение

$$V_n = 0,5 (V_R/\sqrt{N_0}) O.$$

Уменьшение объема пробы ниже этого значения не улучшает разделение, но приводит к снижению фактически достигаемого обогащения, т. е. является нежелательным.

Третьим параметром концентратора являются его геометрические размеры. Сечение концентратора обычно берут равным сечению колонки и задача сводится к определению длины концентратора  $L$ . Ее рассчитывают по формуле (1.64), положив  $\Delta x_n = L$ :

$$L = V_n/S_{\text{кол}}\Gamma_n.$$

Значение  $\Gamma_n$  находят из определенной по выше изложенному методу величины  $V_{\text{тн}}$ , измеренной на колонке объемом  $V_{\text{кол}}$ :

$$\Gamma_n = V_{\text{тн}}/V_{\text{кол}}.$$

В результате проведенных расчетов может получиться, что длина концентратора  $L$  окажется слишком большой, обычно она не пре-

вышает 10—20 см. Ее можно уменьшить, увеличивая  $\Gamma_n$  за счет снижения температуры адсорбции. Если это невозможно, изменяют значение  $V_n$  в указанных выше пределах. Если и это не дает эффекта, необходимо перейти к другому сорбенту.

Адсорбционное концентрирование проводят двумя способами. В первом анализируемый газ пропускают через концентратор до проскока и все количество вещества вводят в хроматограф на стадии десорбции. Во втором через концентратор пропускают больший объем газа, так что проскок заведомо происходит, при этом в хроматограф вводят только то количество вещества, которое соответствует адсорбционному равновесию на стадии адсорбции, т. е. равное  $LS_{\text{конт}} C_n \Gamma_n$ . Первый метод менее чувствителен к колебаниям условий, особенно температуры на стадии адсорбции и десорбции, зато необходимо следить за проскоком.

В качестве сорбентов для концентрирования постоянных газов и легких углеводородов используют молекулярные сита, силикагель, активный уголь и др. При анализе более высококипящих веществ — хроматографические насадки (твердый носитель с неподвижной фазой) и пористые полимерные сорбенты, например тенакс.

Приставка для адсорбционного концентрирования примесей выпускается Дзержинским филиалом НПО «Химавтоматика» для комплектации хроматографов серии «Цвет». В состав приставки, называемой «Устройство обогатительное», входят две обогатительные колонки вместимостью 0,8 и 1,8 см<sup>3</sup>, газовый кран, дроссель, дозатор, печь электрическая, обеспечивающая нагрев колонок до 230 и 360 °С, и сосуд для охлаждающей смеси. Схема устройства приведена на рис. II.38. Узлы обогатительного устройства размещаются на боковой стенке термостата хроматографа, линии анализируемого газа подсоединяются к газовому крану обогатительного устройства. Если анализируемый газ находится под атмосферным давлением, один патрубок крана соединяют с источником газа, другой — с респиратором. Вначале при положении *II* крана (показано пунктиром) продувают систему и обогатительную колонку с сорбентом газом-носителем; целесообразно прогреть колонку при температуре десорбции. Затем подсоединяют анализируемый газ и с помощью дросселя устанавлива-

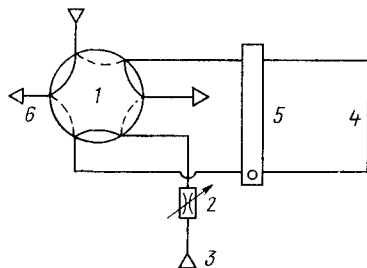


Рис. II.38. Схема устройства для адсорбционного концентрирования:

1 — газовый кран, 2 — дроссель, 3 — ввод анализируемого газа, 4 — концентрирующая трубка, 5 — дозатор, 6 — выход в колонку

ют его расход, который измеряют на выходе пеним измерителем.

Если планируется проведение адсорбции при температуре ниже комнатной, колонку помещают в сосуд с охлаждаемой смесью и, переключая кран в положение *I*, направляют через нее анализируемый газ. При охлаждении до низких температур, например температуры жидкого азота, возможна конденсация основного компонента пробы, например воздуха, вследствие чего в колонке может создаться разрежение. Чтобы предотвратить подсос воздуха из комнаты рекомендуется на 1—2 мин заглушить выходной штуцер. После завершения адсорбции убирают сосуд с хладагентом и, выждав 1—2 мин пока из колонки не выйдет адсорбированный основной компонент, переключают кран в положение *II* и одновременно надвигают на колонку предварительно разогретую печку. Необходимо иметь в виду, что при нагревании пористых полимерных сорбентов на воздухе из них выделяются продукты разложения, поэтому начинать их нагрев следует после вытеснения воздуха из обогатительной колонки газом-носителем.

При использовании капиллярных колонок рассмотренная схема обогащения непригодна, так как поток газа из обогатительной трубки слишком велик для капиллярной колонки. В этом случае при десорбции примесей через обогатительную колонку подают слабый расход газа, а примеси конденсируют в капиллярной петле жидким азотом (криогенное фокусирование). Время десорбции из-за малого расхода газа-носителя может составить 15—20 мин. Не меняя расход газа, а нагревая петлю, десорбируют примеси в капиллярную колонку без деления потока. Поскольку петлю делают обычно из металлического капилляра, ее нагрев можно осуществить, пропуская электрический ток непосредственно через капилляр. Принципиальная схема такого обогатительного устройства приведена на рис. II.39.

Рассмотрим конструкцию и принцип работы некоторых устройств для сорбционного концентрирования с криогенным фокусированием, применяемых в выпускаемых хроматографах

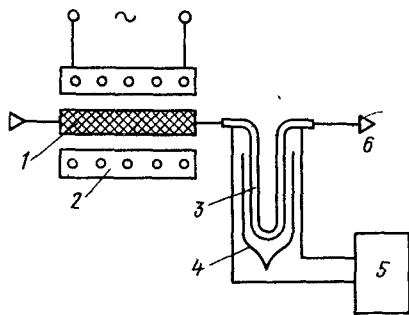


Рис. II.39. Схема концентрирующего устройства для капиллярной колонки: 1 — трубка с сорбентом, 2 — печь; 3 — капиллярная петля; 4 — сосуд Дьюара, 5 — автотрансформатор; 6 — выход в колонку

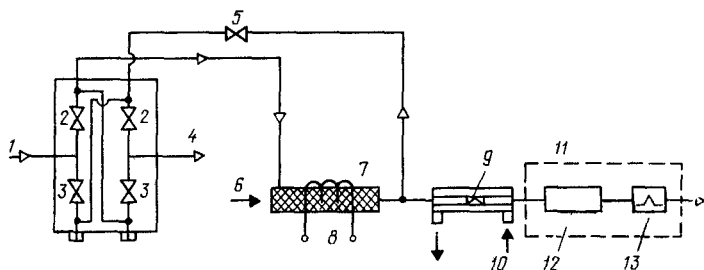


Рис II.40 Пневматическая схема адсорбционного концентрирования

1 — вход газа-носителя, 2, 3 — клапаны, 4 — сброс газа из концентратора, 5 — запорный клапан, 6 — ввод пробы, 7 — концентратор, 8 — нагреватель, 9 — ловушка, 10 — хладагент (жидкий  $N_2$ )  
11 — термостат, 12 — колонка, 13 — детектор

и позволяющих анализировать пробы, растворенные в подходящем растворителе.

На рис. II.40 приведена схема установки для адсорбционного концентрирования с криогенным фокусированием, реализованная в капиллярном газовом хроматографе КГХ-100 (СКБ АН ЭССР, г. Таллинн). Проба вводится шприцем в поток газа-носителя, направление которого указано стрелками (клапаны 2 открыты, клапаны 3 закрыты). Постоянные пневмосопротивления, которые распределяют поток газа между колонкой и концентратором, подбирают предварительно. Поток газа-носителя переключается на обратный (клапаны 2 закрыты, 3 — открыты) и растворитель выдувается в атмосферу при умеренном нагреве концентратора. Затем направление потока восстанавливается, закрывается запорный клапан 5 и проба десорбируется в криогенную ловушку 9, из которой она переносится в хроматографическую колонку 12 путем нагрева ловушки.

На рис. II.41 представлена конструкция криогенного концентратора хроматографа «Сихромат-2» фирмы «Сименс» (Бельгия), в котором одновременно может быть осуществлен перенос

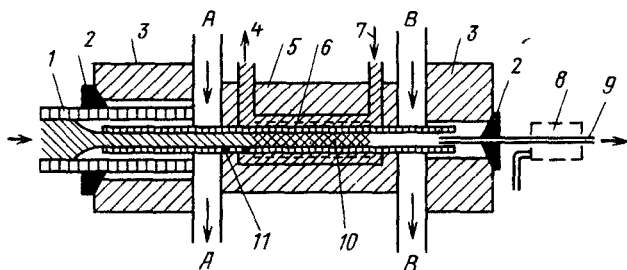


Рис. II.41. Конструкция устройства для криогенного концентрирования пробы:

1 — аналитическая колонка, 2 — уплотнения, 3 — крышка, 4, 7 — выход и вход жидкого  $N_2$ , 5 — корпус, 6 — нагреватель, 8 — дополнительная ловушка, 9 — капиллярная колонка, 10 — ловушка, 11 — поперечная кварцевая трубка с адсорбентом

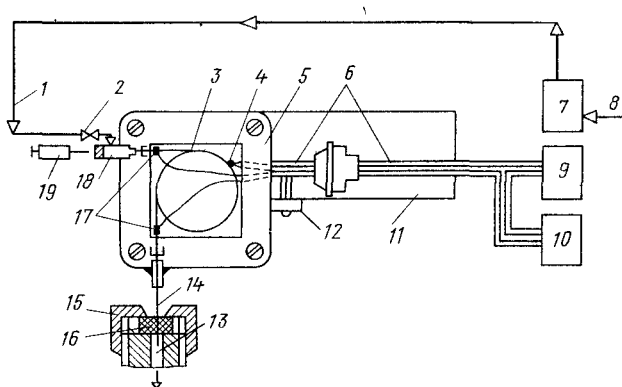


Рис II 42 Схема устройства для предварительного концентрирования проб

1 - газовая линия 2 запорный вентиль 3 предколонка из нержавеющей стали с прямым нагревом 4 термopapa 5 корпус 6 жгут с разъемом 7 блок подготовки газов, 8 вход газа носителя 9 источник питания 10 регулятор температуры 11 - ручка 12 - кнопки управления 13 испаритель 14 игла 15 ганка 16 мембрана 17 изоляторы 18 - устройство для ввода пробы 19 шприц

пробы из аналитической колонки 1 в капиллярную 9 и дополнительное фокусирование пробы в ловушке 8 на входе капиллярной колонки. Концентрирование проводится на сорбенте в кварцевой трубке 11, которая может охлаждаться жидким азотом (4,7,10) и нагреваться с помощью нагревателя 6. Давление дополнительных потоков газа А и В устанавливается таким образом, чтобы контролировать направление и расход потока газа-носителя.

Концентрирование пробы можно осуществить на устройстве, представленном на рис. II.42. Оно предназначено для использования в газовом хроматографе «Кристалл-2000». Проба вводится шприцем 19 в потоке газа-носителя 1 в концентратор в тот момент, когда он отсоединен от хроматографа. Растворитель, аналогично уже описанному ранее, выдувается в атмосферу. Затем игла 14 концентратора вводится в испаритель 13 через мембрану 16, нажимают кнопку 12, предколонка 3 с прямым нагревом электрическим током быстро нагревается (5—10 с) и проба в потоке газа-носителя вводится в испаритель. УПК позволяет получить степень обогащения, например для линдана или трибутилфосфата, от 100 до 500 в зависимости от исходной концентрации анализируемых веществ в смеси.

В качестве сорбента для концентрирования фосфорорганических пестицидов с коэффициентами обогащения не менее 100 используют полифенилхиноксалин, изготовленный в ИРЕА (г. Москва) или «Тенакс» (США). Концентратор включается в газовую схему любого серийного газового хроматографа последовательно с аналитической колонкой и соединяется с испарителем с помощью иглы, введенной через мембрану испарителя. Объем вводимой в концентратор пробы до 500 мкл. Блок

управления концентратором обеспечивает регулируемый нагрев сорбента при 40—400 °С. Продолжительность нагрева до 300 °С не более 50 с, точность поддержания и установки заданной температуры не хуже  $\pm 1$  и  $\pm 3$  °С, соответственно, потребляемая мощность не более 200 Вт. Для предварительного отдува сорбированного вместе с пробой растворителя используют отдельный газовый канал с расходом азота не менее 30 см<sup>3</sup>/мин. Представленные выше данные показывают, что метод концентрирования примесей на сорбенте достаточно прост и позволяет повысить чувствительность анализа в 100 и более раз.

Кроме использования термодесорбции возможен смыв адсорбированных примесей подходящим растворителем, желательно, чтобы последний не регистрировался при этом применяемым детектором. При работе с ПИД таким растворителем может служить сероуглерод. К недостаткам этого метода относится меньшее обогащение примеси: при термодесорбции все накопленное в концентраторе количество вещества вводится в хроматограф одной дозой, в случае же использования растворителя весь его объем (обычно не менее 0,5—1,0 мл) нельзя ввести в хроматограф сразу и его приходится разделять на отдельные порции.

Адсорбционное концентрирование можно применять и при анализе жидкостей, например природных или сточных вод. Пробу воды пропускают через колонку с сорбентом, при этом примеси адсорбируются, а вода выходит из колонки. Для проведения десорбции в этом случае применяют не тепловое воздействие, а смывают примеси небольшим количеством (обычно 0,5—2,0 мл) подходящего растворителя. Последующий анализ осуществляют методами газовой или жидкостной хроматографии. В качестве концентратора можно использовать бюретку. Подбор адсорбента при концентрировании из жидких систем — более трудная задача, чем при концентрировании из газов, так как степень обогащения в этом случае сильно зависит от растворителей в исходной пробе и получающемся концентрате. Редко удается добиться 100%-го извлечения примеси и целесообразно оценить прежде всего коэффициент извлечения, равный отношению массы примеси в растворителе, пропущенном через концентратор на стадии десорбции  $m_k$  к массе этой примеси в исходной пробе  $m_n$ :

$$k_n = m_k / m_n$$

Величину  $k_n$  определяют, пропуская через сорбент калибровочные растворы объемом  $V_n$  с известной концентрацией примеси  $C_n$ ,  $m_k$  находят из хроматограмм концентрата, полученного после десорбции. Коэффициент  $k_n$  рассчитывают по соотношению:

$$k_n = m V_k / V_{ш} C_n V_n,$$

где  $m$  — масса примеси в пробе, вводимой в хроматограф (находят по градуировочному графику высота пика — масса пробы),  $V_k$  — объем всего концентрата,  $V_{ш}$  — объем пробы, дозируемой в хроматографе

Коэффициент обогащения равен соответственно

$$O = C_k / C_n = m_k V_n / m_n V_k = k_n V_n / V_k.$$

Подбор сорбента приходится сочетать с подбором подходящего растворителя, обеспечивающего быстрый смыв адсорбированной примеси с сорбента. Его лучше проводить на модельных смесях с более высоким содержанием примесей, которые можно определять прямым вводом в хроматограф. Объем до проскока в случае физической адсорбции не зависит от концентрации, если диапазон ее изменения соответствует линейной области изотермы. Это вытекает из уравнения материального баланса. Если через концентратор объемом  $V_{\text{кол}}$  пропущен до проскока примеси объем  $V_n$ , то

$$V_n C_n = V_{\text{кол}} a_n \text{ или } V_n / V_{\text{кол}} = a_n / C_n.$$

Отношение, стоящее в правой части,— это тангенс угла наклона изотермы, постоянный при ее линейности, и в этом диапазоне концентраций отношение  $V_n / V_{\text{кол}} = \text{const}$ . Именно это отношение является показателем емкости сорбента в динамических условиях, а не величина  $m_n / V_{\text{кол}}$  (в мг/см<sup>3</sup> сорбента), как в ионном обмене. При использовании отношения  $m_n / V_{\text{кол}}$  создается неверное представление, что если уменьшить концентрацию  $C_n$ , например в 2 раза, то  $V_n$  можно увеличить в 2 раза, поскольку их произведение  $m_n = V_n C_n$  и соответственно отношение  $m_n / V_{\text{кол}}$  при этом не изменится.

Обычно для концентрирования берут 0,5—1,5 г сорбента зернением от 0,1 до 0,5 мм. Поместив его в концентратор и пропустив 0,3—0,5 л воды (или другой жидкости), содержащей интересующие примеси, необходимо убедиться, что содержание примеси в воде после сорбента резко уменьшилось. В противном случае следует сменить сорбент. Если сорбция примеси на данном адсорбенте оказывается достаточной, следует подобрать растворитель, вызывающий более полную ее десорбцию. Этот растворитель должен неограниченно смешиваться с основным компонентом пробы, иначе последний, обволакивая поверхность гранул сорбента, воспрепятствует их контакту с растворителем и десорбции примеси. Можно, конечно, использовать промежуточный растворитель, но это усложнит операции. Проводя десорбцию одинаковыми объемами (1—2 мл), подбирают растворитель, концентрация примеси в котором после десорбции будет наибольшей, и для этого растворителя рассчитывают  $k_n$ . Желательно, чтобы последняя была не ниже  $0,3 \div 0,5$ .

Далее приступают к оптимизации условий концентрирования, используя модельные растворы с концентрациями примеси, близкими к реальным, или сами реальные пробы. Варьируя объем растворителя  $V_k$ , подбирают его оптимальное значение: с увеличением  $V_k$  коэффициент  $k_n$  сначала увеличивается, но затем



стабилизируется на постоянном значении; величина  $V_{к,оп}$ , соответствующая этой стабилизации, является оптимальной. Затем начинают варьировать величину  $V_n$ : величина  $k_n$  первоначально не меняется, а затем начинает уменьшаться из-за проскока примеси; значение  $V_{н,пр}$  перед началом снижения  $k_n$  также является оптимальным. Количество сорбента не является определяющим: с изменением этого количества пропорционально меняется  $V_{к,оп}$  и  $V_{н,пр}$ , значения основных показателей  $k_n$  и  $O$  при этом практически остаются прежними.

Количественный анализ при адсорбционном концентрировании проводят обычно методом абсолютной калибровки, готовя газовые смеси или калибровочные растворы с известным содержанием примеси, подвергая их операции концентрирования и хроматографического разделения, в результате получают калибровочный график в координатах: высота (площадь) пика — исходная концентрация примеси в пробе. Возможные потери вещества на стадии адсорбции или десорбции этим графиком учитываются.

### 6.2.2. Анализ равновесной паровой фазы

Анализ равновесной паровой фазы (АРПФ) применяют в тех случаях, когда необходимо определить содержание летучих веществ в жидкостях или твердых телах, причем непосредственный ввод анализируемого вещества в хроматограф по каким-либо причинам нежелателен. Такая ситуация возникает, например, при анализе различных биологических тканей и жидкостей (крови, мочи), природных и сточных вод, алкогольных и безалкогольных напитков, пищевых продуктов, полимерных материалов и т. д. Анализ равновесной паровой фазы в простейшем варианте заключается в том, что анализируемый объект помещают в герметичный сосуд, выдерживают при определенной температуре до установления равновесия между газовой и жидкой или твердой фазами, затем газовую пробу вводят в хроматограф. При этом достигаются по крайней мере три цели: избегают ввода в испаритель хроматографа жидких или твердых проб, которые могут разлагаться, сорбироваться на начальных участках колонки, вызывая появление дополнительных пиков или загрязняя систему ввода хроматографа и колонку (например, в случае биологических жидкостей); получают информацию о содержании веществ в газовой фазе над объектом, которое часто больше интересует исследователя, чем содержание летучих компонентов в самом объекте, например при изучении аромата пищевых продуктов, напитков или вредных веществ, выделяющихся из полимерных строительных материалов; существенно снижают содержание в пробе основных компонен-

тов, пики которых могут налагаться на пики примесей, и в некоторых случаях добиваются обогащения примесей.

Различают два основных метода АРПФ: статический, который уже был выше рассмотрен и, который заключается в установлении равновесия в замкнутом сосуде, и динамический, при котором газ непрерывно пропускают через жидкость или твердый материал.

Рассмотрим более подробно статический вариант АРПФ. В основе расчетов по этому методу лежит уравнение материального баланса: вещество, содержавшееся в объеме жидкой фазы  $V_{ж}$  при концентрации  $C_{ж0}$  распределяется между этой и газовой фазой объемом  $V_{г}$ , причем концентрация в жидкости уменьшается до величины  $C_{ж1}$ , а в газовой фазе устанавливается концентрация  $C_{г1}$ :

$$C_{ж0}V_{ж} = C_{ж1}V_{ж} + C_{г1}V_{г}.$$

После установления равновесия концентрации  $C_{г1}$  и  $C_{ж1}$  связаны через коэффициент распределения  $K$ :

$$C_{ж1} = K C_{г1},$$

откуда

$$C_{ж0}V_{ж} = C_{г1}KV_{ж} + C_{г1}V_{г} \quad (II.4)$$

или

$$C_{ж0} = C_{г1}(K + V_{г}/V_{ж}). \quad (II.5)$$

Полученная формула позволяет оценить условия, при которых статический вариант АРПФ приводит к концентрированию примесей. Концентрация в максимуме пика пропорциональна количеству вещества в пробе; при дозировании непосредственно жидкой пробы с концентрацией примеси  $C_{ж0}$  это количество равно  $C_{ж0}V_{нж}$ , а при дозировании равновесной паровой фазы с концентрацией примеси  $C_{г1}$  оно равно  $C_{г1}V_{нг}$ , где  $V_{нж}$ ,  $V_{нг}$  — объемы жидкой и газовой пробы соответственно.

Чтобы метод АРПФ имел преимущество перед прямым вводом жидкости, необходимо выполнение условия

$$C_{г1}V_{нг} > C_{ж0}V_{нж} \quad \text{или} \quad V_{нг}/V_{нж} > C_{ж0}/C_{г1}.$$

При испарении жидкости объем увеличивается приблизительно в  $10^3$  раза. Подставляя эту цифру в левую часть неравенства, а правую выражая в соответствии с (II.5), получим

$$K + (V_{г}/V_{ж}) < 10^3.$$

Отсюда видно, что для увеличения обогащения в методе АРПФ необходимо уменьшать коэффициент  $K$  и отношение  $V_{г}/V_{ж}$ ; для концентрирования примесей величина  $K$  не должна быть больше  $10^3$ . При малых  $K$  существенное влияние начинает оказывать отношение  $V_{г}/V_{ж}$ . Степень концентрирования, достигаемую в

статическом варианте АРПФ, можно оценить из соотношения:

$$O = C_{r1} V_{нг} / C_{ж0} V_{нж} = 10^3 / [K + (V_r / V_{ж})]$$

Если принять  $K = 10$  и  $V_r / V_{ж} = 0,1$ , то  $O \approx 100$ .

Имеется ряд приспособлений для осуществления статического варианта АРПФ, которые можно подразделить на две большие группы: с постоянным и переменным объемом газовой фазы. Простейшее устройство первого типа представляет собой сосуд с резиновым уплотнением (пенициллиновый флакончик), в который помещают анализируемый объект и из газового пространства которого после установления равновесия отбирают газовой шприцем пробу паровой фазы. Чтобы после отбора этой пробы давление в сосуде и в шприце не получилось ниже атмосферного, шприц предварительно наполняют воздухом или газом до объема, который планируют отобрать, после прокалывания уплотнения иглой несколько раз прокачивают шприц для восстановления равновесия, после чего отбирают пробу. Метод чрезвычайно прост, его основной недостаток — возможная адсорбция анализируемых веществ стенками сосуда и особенно резиновым уплотнением, что может приводить к погрешности в тех случаях, когда при количественных расчетах необходимо определить коэффициент распределения  $K$ . Газовую фазу из сосуда можно отбирать также с помощью крана-дозатора, подсоединяя к выходному штуцеру последнего медицинский шприц, с помощью которого прокачивают паровую фазу из сосуда через петлю крана. Широко распространен также метод, при котором в сосуде создается избыточное давление инертного газа, превышающее давление на входе в хроматограф, после чего этот вход соединяют с газовым пространством сосуда.

При использовании сосудов с постоянной вместимостью трудно проводить эксперименты по определению  $K$  (см. ниже), поэтому для количественных расчетов лучше всего использовать метод абсолютной калибровки по концентрации в жидкости или метод внутреннего стандарта. В первом из них готовят стандартные растворы с известными концентрациями анализируемых веществ  $C_{ж0}^n$ , проводят с ними все операции АРПФ, измеряют высоты или площади пиков, соответствующие этим концентрациям,  $h^n$  и строят калибровочный график  $h^n = f(C_{ж0}^n)$ , по которому определяют затем неизвестные концентрации  $C_{ж0}^x$ . В простейшем варианте можно приготовить один стандартный раствор с концентрацией, близкой к концентрации в анализируемом объекте, а искомую концентрацию определить из пропорции ( $h^x$  — высота пика при дозировании анализируемой пробы)

$$C_{ж0}^x = C_{ж0}^n h^x / h^n \quad (II\ 6)$$

Для осуществления этого метода не требуется знание величин  $V_r$ ,  $V_{ж}$ ,  $K$ , а также объема вводимой пробы, но предполагается

их постоянство как в процессе калибровки, так и проведения измерения.

Если постоянство дозируемого объема обеспечить трудно, используют метод внутреннего стандарта. В этом случае в анализируемый раствор вводят стандартное вещество с известной концентрацией  $C_{ж0}^{ст}$ , а для расчета пользуются соотношением

$$C_{ж0}^r = k C_{ж0}^{ст} h^r / h^{ст}, \quad (II.7)$$

где  $k$  — калибровочный коэффициент, который следует определить экспериментально;  $h^{ст}$  — высота пика стандарта

Для этого готовят калибровочный раствор с известными концентрациями анализируемого вещества  $C_{ж0}^n$  и стандарта  $C_{ж0}^{ст}$ . Записывая уравнение (II.7) по отношению к  $C_{ж0}^n$  (индексы « $x$ » изменяются на « $n$ »), находят  $k$ :

$$k = C_{ж0}^n h^{ст} / (C_{ж0}^{ст} h^n).$$

Смысл применения внутреннего стандарта заключается в том, что при всех расчетах используют отношение высот пиков стандартного и анализируемого вещества, полученных при дозировании одной пробы, а это отношение от размера пробы не зависит (при колебаниях размера пробы высоты обоих пиков меняются в одинаковое число раз, а их отношение сохраняется неизменным). В формуле (II.6) берется отношение высот пиков из разных проб, которое, естественно, чувствительно к колебаниям размера пробы.

В обоих рассмотренных методах требуется, однако, постоянство коэффициента  $K$  при калибровке и анализе, для чего необходимо, чтобы состав анализируемой пробы и растворителя, используемого для приготовления калибровочных растворов по всем компонентам, кроме анализируемых, был одинаковым. Это вызвано тем, что различные посторонние примеси могут оказывать существенное влияние на  $K$ . При анализе сложных объектов типа биологических жидкостей или сточных вод обеспечить выполнение этого требования трудно. В этом случае необходимо определять  $K$  непосредственно в анализируемом растворе, что проще осуществить в системах с переменным объемом газовой фазы, позволяющих полностью заменить паровую фазу на чистый газ. В простейшем варианте такая система состоит из сосуда с горловиной, закрытой резиновой прокладкой, и отводом в нижней части, связанным гибкой трубкой с воронкой, перед которой имеется кран (рис. II.43). Вся система заполняется анализируемой жидкостью, после чего в нее вводят известный объем воздуха или инертного газа, вытесняющий часть жидкости в воронку. Выравнивая уровни жидкости в воронке и сосуде, устанавливают в последнем атмосферное давление. По мере отбора паровой фазы поднимают воронку и соответственно уровень

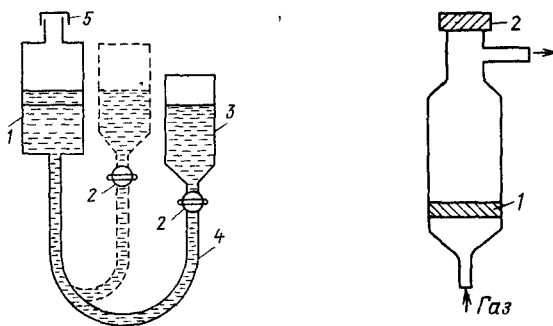


Рис. II.43. Схема установки для проведения статического варианта АРПФ при переменном объеме паровой фазы:

1 — сосуд для установления равновесия, 2 — кран, 3 — воронка, 4 — резиновая трубка, 5 — резиновый колпачок

Рис. II.44. Схема устройства для динамического варианта АРПФ:

1 — стеклянный фильтр, 2 — резиновый колпачок

жидкости в сосуде, обеспечивая все время сохранение в нем атмосферного давления.

В качестве сосуда переменного объема широко применяют также газовые шприцы, которые частично заполняют анализируемой жидкостью. По мере отбора проб поршень шприца поднимается. Для термостатирования устройства на него может быть надета рубашка из плексиглаза, подключенная к термостату.

Устройства с переменным объемом позволяют избежать приготовления калибровочных растворов, для расчетов используют непосредственно уравнение (II.5). В этом случае хроматограф калибруют по газовой фазе, для чего готовят серию газовых смесей с известными концентрациями  $C_r^n$ , получают хроматограммы и строят калибровочный график  $h^n = k_r C_r^n$ . По этому графику, проводя АРПФ, находят затем значение  $C_{r1}$ . Чтобы перейти к искомой величине  $C_{ж0}$ , необходимо кроме  $V_r$  и  $V_ж$  знать  $K$ . Простейший метод определения  $K$  заключается в двукратном измерении  $C_r$  при полной замене газовой фазы на чистый газ в промежутке между измерениями. Если для этой процедуры используют термостатируемый шприц, то заполнив его частично анализируемой жидкостью, дождавшись установления равновесия и измерив концентрацию  $C_{r1}$ , вытесняют из шприца газовую фазу, поднимая поршень, а затем опуская его до прежней отметки, набирают в него чистый газ. Дождавшись установления равновесия, определяют концентрацию в газовой фазе  $C_{r2}$ . При втором определении исходная концентрация в жидкости будет уже равна  $C_{ж1}$  и поэтому уравнение (II.4) необходимо переписать в виде

$$C_{ж1}V_ж = C_{ж2}V_ж + C_{r2}V_r \text{ или } KC_{r1}V_ж = C_{r2}(KV_ж + V_r),$$

откуда

$$K = \left( \frac{C_{12}}{C_{11} - C_{12}} \right) \frac{V_r}{V_{ж}} = \frac{h_2}{h_1 - h} \frac{V_r}{V_{ж}}, \quad (II.8)$$

где  $h_1, h_2$  - высоты пиков при первом и втором определении.

Этот метод применим при значениях  $K \leq 10$ , при больших значениях  $K$  точность метода снижается. Ее можно повысить, проведя  $n$  описанных выше операций. Действительно, выразим из уравнения (II.8)  $C_{12}$ :

$$C_{12} = C_{11} K / [K + (V_1/V_{ж})]$$

При второй операции

$$C_{13} = C_{12} K / [K + (V_1/V_{ж})] = C_{11} K^2 / [K + (V_1/V_{ж})]^2$$

Отсюда по аналогии после  $n$  операций

$$C_{1, n+1} = C_{11} K^n / [K + (V_1/V_{ж})]^n$$

и, соответственно, выражая  $K$ , получим

$$K = C_{1, n+1}^{1/n} / (C_{1, n+1}^{1/n} - C_{1, n+1}^{1/n} V_1/V_{ж})$$

Погрешность определения  $K$  уменьшается в  $n$  раз или, соответственно, увеличивается верхний предел надежного определения  $K$  по сравнению с таковым для процесса с однократным вытеснением паровой фазы. После подстановки этого значения  $K$  в формулу (II.5) и замены всех отношений концентраций на отношения высот пиков получим:

$$C_{1, n+1} = C_{11} \frac{(V_1/V_{ж}) (h_1/h_{n+1})^{1/n}}{(h_1/h_{n+1})^{1/n} - 1},$$

Для расчета по этому уравнению необходимо знать отношение высот пиков после первого и  $n$ -го установления равновесия и концентрацию паровой фазы при первом определении.

Для веществ с большими коэффициентами  $K > 10^3$  статический вариант АРПФ не дает концентрирования примеси в газовой фазе, кроме того для точного определения  $K$  по описанному методу требуется слишком много раз менять паровую фазу на чистый газ, что удлиняет анализ и делает его чересчур трудоемким. В этом случае целесообразно использовать динамические варианты АРПФ. Их проводят, например, в устройстве, типа изображенного на рис. II.44. Отмеренный объем жидкости помещают в сосуд на пластинку из пористого стекла и через слой жидкости пропускают газ. После прохождения через жидкость объема газа  $dV$  концентрация в жидкости уменьшается на величину  $dC_{ж}$ , а концентрация в газе становится равной  $C_1 = C_{ж}/K$ . Из уравнения материального баланса

$$V_{ж} dC_{ж} = C_{ж} dV_1/K,$$

после разделения переменных и интегрирования в пределах от  $C_{ж0}$  до  $C_{ж}$  и от 0 до  $V_r$  получим

$$\ln (C_{ж0}/C_{ж})=V_r/KV_{ж}. \quad (II.9)$$

Имеется две разновидности динамического варианта АРПФ. В первой из них анализируют сначала в статических условиях равновесную паровую фазу с концентрацией  $C_{г0}$ , находящуюся в контакте с жидкостью состава  $C_{ж0}$ , затем пропускают объем газа  $V_r$ , в результате чего концентрация в жидкости снижается до  $C_{ж1}$  и вновь в статических условиях измеряют равновесную с  $C_{ж1}$  концентрацию газа  $C_{г1}$ . Заменяя в уравнении (II.9)

$$C_{ж0}=KC_{г0}, \quad C_{ж1}=KC_{г1}$$

получим

$$K=(V_r/V_{ж})/\ln (C_{г0}/C_{г1})=\left(\frac{V_r}{V_{ж}}\right)/\ln \frac{h_0}{h_1},$$

откуда легко перейти к  $C_{ж0}$ :

$$C_{ж0}=C_{г0}K=\frac{C_{г0}V_r}{V_{ж}\ln (h_0/h_1)}.$$

В приведенных формулах пренебрегали объемом газового пространства в сосуде, считая его малым по сравнению как с пропущенным объемом  $V_r$ , так и с произведением  $KV_{ж}$ .

Во второй разновидности АРПФ отбор проб проводят не из паровой фазы над раствором, а непосредственно из газового потока, например с помощью газового крана. В этом случае не измеряют исходную концентрацию  $C_{г0}$ , равновесную с  $C_{ж0}$ , а некоторую концентрацию  $C_{г1}$ , равновесную с  $C_{ж1}$ , образовавшуюся в растворе после пропускания объема газа  $V_{г1}$ , а затем концентрацию  $C_{г2}$  после пропускания объема  $V_{г2}$  (оба объема измеряют от начала пропускания). Запишем уравнение (II.9) для обоих определений, заменив логарифм отношения разностью логарифмов:

$$\ln C_{ж0}-\ln C_{ж2}=V_{г2}/(KV_{ж}),$$

$$\ln C_{ж0}-\ln C_{ж1}=V_{г1}/(KV_{ж}).$$

После вычитания из первого уравнения второго получим

$$\ln (C_{ж1}/C_{ж2})=(V_{г2}-V_{г1})/KV_{ж},$$

откуда после замены  $C_{ж1}=KC_{г1}$  и  $C_{ж2}=KC_{г2}$  найдем уравнение для  $K$ :

$$K=\frac{V_{г2}-V_{г1}}{V_{ж}\ln (h_1/h_2)}. \quad (II.10)$$

Теперь нетрудно найти из уравнения (II.9) выражение для  $C_{ж0}$ :

$$C_{ж0}=C_{ж1}\exp [V_{г1}/(KV_{ж})]=KC_{г1}\exp [V_{г1}/(KV_{ж})].$$

### 6.3. КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

В зависимости от решаемой аналитической задачи (отнесение к индивидуальным химическим соединениям пиков на хроматограмме смеси, состав которой ориентировочно известен; групповой анализ; полная идентификация компонентов) с целью качественного анализа могут использоваться как чисто хроматографические приемы (сравнение параметров удерживания, получение для групп веществ корреляционных зависимостей типа параметр удерживания — физико-химические характеристики, использование селективных детекторов, реакционная хроматография, пиролитическая хроматография), так и варианты, сочетающие газовую хроматографию с другими физико-химическими методами анализа (препаративный сбор фракций с их последующим исследованием, хромато-масс-спектрометрия, сочетание хроматографа с ИК-спектрометром и др.). На современном уровне развития методологии аналитической химии, аналитического приборостроения, вычислительной техники наибольшую достоверность идентификации обеспечивают комбинированные методы. Однако их аппаратное оформление достаточно сложно, приборы имеют высокую стоимость и реально эксплуатируются только в крупных аналитических центрах либо при решении неординарных задач. Поэтому рассматриваемые ниже чисто хроматографические приемы качественного анализа и в настоящее время широко применяют в аналитической практике.

**Использование литературных данных по параметрам удерживания.** Из широкого набора параметров удерживания для целей идентификации при сопоставлении с опубликованными данными используют индексы удерживания и относительные времена удерживания. Чтобы сопоставление было корректным, необходимо измерения выполнять в условиях, идентичных тем, при которых получены опубликованные данные. Эти условия должны контролироваться в первую очередь по следующим пунктам: 1) тип сорбента (марка, фирма-изготовитель, количество неподвижной фазы и характеристики твердого носителя, условия предварительной активации или обработки сорбента, условия кондиционирования колонки); 2) температурные режимы колонки и системы ввода пробы; 3) параметры (длина, диаметр, материал) и условия предварительной подготовки колонки; 4) объем вводимой пробы; 5) расход, входное и выходное давление газа-носителя; 6) способ измерения мертвого времени.

Отклонения от номинальных условий приводят к погрешностям измерения параметров удерживания. Основными источниками погрешностей являются: 1) температурные флуктуации термостатируемых зон хроматографа и погрешности задания и измерения температуры колонки; 2) невоспроизводимость характеристик сорбента; 3) старение колонки; 4) флуктуации



расхода газа-носителя; 5) погрешности дозирования в случае нелинейности изотермы сорбции; 6) несинхронность операций ввода пробы и пуска (фиксации момента дозирования) средств измерения времени удерживания (секундомера, самопишущего потенциометра, интегратора, микропроцессора); 7) погрешности средств измерения времени удерживания (погрешности секундомера и электронных систем пренебрежимо малы, существенную погрешность может вносить нелинейность скорости протяжки диаграммной ленты); 8) погрешности измерения мертвого времени системы.

Из литературы известно, что для определения неисправленного объема удерживания с погрешностью 1% необходимо поддерживать и задавать температуру и расход газа-носителя с погрешностью не выше  $\pm 0,1^\circ\text{C}$  и  $\pm 0,5\%$  соответственно. На серийных газовых хроматографах и насадочных колонках с содержанием неполярной неподвижной фазы на твердом носителе 15—20% (масс.) межлабораторная воспроизводимость индексов удерживания Ковача составляет  $\pm (1-3)$  единицы. При переходе к полярным неподвижным фазам расхождения могут возрастать до  $\pm 5$  единиц индекса. Межлабораторная воспроизводимость индексов удерживания на капиллярных колонках, как правило, составляет  $\pm (1-2)$  единицы индекса.

Казалось бы, что при такой низкой погрешности прямое сопоставление набора экспериментально найденных численных значений параметров удерживания на нескольких неподвижных фазах различной полярности с соответствующими справочными данными обеспечивает надежную идентификацию веществ. Однако на практике, когда, в частности, используют сорбенты с 3—5% неподвижной фазы при очень хорошей сходимости может быть получена очень плохая воспроизводимость результатов (по отношению к опубликованным). Причина этого — отсутствие стандартизованных сорбентов и колонок при наличии неконтролируемых факторов. Так, в газожидкостных насадочных колонках используют твердые носители, характеристики которых от партии к партии могут существенно различаться. Их поверхностные свойства зависят также от длительности и условий хранения. Контроль химического состава, молекулярно-массового распределения, чистоты наносимых неподвижных фаз не проводится. Процедуры подготовки твердого носителя, нанесения неподвижной фазы, кондиционирования сорбента могут незначительно расходиться в деталях, которые сказываются на качестве жидкой пленки и сорбционных свойствах готового материала. По мере эксплуатации характеристики колонки меняются во времени за счет процессов уноса и старения неподвижной фазы, а также эффекта «памяти» к предыдущим пробам.

Все сказанное относится и к капиллярным колонкам, где хотя, как правило, и отсутствует твердый носитель, но при-

существует многоступенчатая — промывка, травление, выщелачивание, деактивация, модификация, силилирование — процедура подготовки внутренней поверхности капилляра к нанесению неподвижной фазы.

Низкую межлабораторную воспроизводимость обычно связывают с наличием систематических погрешностей. И литературные и экспериментальные данные отягощены (в различной степени) неисключенными составляющими систематической погрешности, но говорить о правильности результата измерения в данном случае трудно, поскольку достоверно неизвестно истинное значение измеряемого параметра. Следовательно, и невозпроизводимость при сопоставлении параметров удерживания нельзя объяснить систематическими погрешностями, т. е. неясно, какой из результатов (справочный или экспериментальный) ближе к истинному. Фактически измерения проводят на различных сорбентах (колонках) и расхождения в измеряемых параметрах есть мера, характеризующая степень их неидентичности.

Таким образом, несовпадение (как на одном, так и на нескольких сорбентах) численного значения найденного параметра удерживания предполагаемого компонента  $X$  с опубликованным для известного вещества  $A$  еще не означает, что  $A \neq X$ . Точно также как и совпадение параметров удерживания  $A$  и  $X$  на одном сорбенте еще не означает, что  $A = X$ . Только совпадение параметров удерживания  $A$  и  $X$  на нескольких сорбентах различной природы позволяет с некоторой достоверностью (доля достоверности растет с увеличением числа используемых для сравнения сорбентов) заключить, что  $A = X$ .

**Использование метода метки.** Обычно этот метод применяют для отнесения компонентов анализируемой смеси к предполагаемым соединениям. В простейшем варианте он реализуется как метод добавки: сравнивают две полученные в одинаковых условиях хроматограммы — исходного образца и образца с добавкой вещества  $A$ . Если на второй хроматограмме появился дополнительный пик, то вывод однозначен: вещества  $A$  в анализируемом образце нет. Если один из пиков (например,  $X$ ) на второй хроматограмме увеличился в размерах (по сравнению с первой хроматограммой), то вероятно, что  $X = A$ , хотя возможно и случайное наложение. Для подтверждения той или иной версии следует повторить опыты на одной или нескольких колонках, различающихся по полярности. Количество добавляемого вещества должно примерно соответствовать содержанию идентифицируемого компонента в анализируемой пробе, иначе (особенно в случае сложных многокомпонентных смесей) пик добавки может наложиться сразу на несколько пиков первой хроматограммы, что резко увеличит неопределенность расшифровки.

В ситуациях, когда малое количество анализируемой пробы

не позволяет проводить манипуляций с добавками, либо когда нежелательно «загрязнять» пробу добавками, стандартные соединения хроматографируют на той же колонке отдельно до или после пробы и проводят непосредственное сравнение времен удерживания. Следует принять меры, чтобы возможная зависимость времени удерживания от нагрузки не исказила результаты сравнения (т. е. сопоставлять удерживание примерно равных по величине пиков либо поставить дополнительные опыты и экстраполировать время удерживания к нулевому объему пробы).

В тех случаях, когда задача качественного анализа сводится к выявлению в анализируемой пробе лишь отдельных характерных компонентов либо группы компонентов без детального отнесения индивидуальных пиков, используют прием, названный методом «отпечатков пальцев». Метод состоит в простом сопоставлении стандартной и контрольной хроматограмм, полученных в одинаковых условиях на одном и том же приборе. Проиллюстрируем этот метод примером выявления источников загрязнения воды нефтепродуктами [52].

Предварительно была составлена классификационная картотека различных нефтепродуктов. Для этого записывали хроматограммы образцов нефтепродуктов, производимых Московским нефтеперерабатывающим заводом, а также применяемых различными предприятиями и автохозяйствами. Использовали колонки размером 1,8 м·3 мм, заполненные хромосорбом  $W=AW$  0,175—0,25 мм (60—80 меш.) с 4 типами неподвижных фаз (3%): метилсилоксан — OV-101, метилкарборансилоксан — дексил 300, фенилкарборансилоксан — дексил 400, нитрилкарборансилоксан — дексил 410. Кондиционирование сорбентов в течение 5—7 ч при температурах, близких к максимальным, обеспечивало стабильность нулевой линии во время анализа нефтепродуктов до  $C_{38}$  в режиме линейного программирования температуры. Условия газохроматографического разделения подбирали в соответствии с типом нефтепродуктов, присутствующих в анализируемых пробах. Пример записи вносимых в классификационную картотеку хроматограмм стандартных образцов нефтепродуктов (сорбент — с дексилом 400 при скорости программирования температуры 4 град/мин) представлен на рис. II.45.

С использованием зависимостей исправленных температур удерживания от числа атомов углерода в молекулах гомологов было установлено, что бензиновые фракции охватывают диапазон  $n$ -парафинов  $C_5$  —  $C_{12}$ , осветительный керосин —  $C_8$ — $C_{16}$ , дизельное топливо —  $C_8$ — $C_{25}$  (зимнее) и  $C_9$ — $C_{27}$  (летнее); состав различных марок минеральных масел и консистентных смазок соответствует  $n$ -парафинам  $C_{16}$ — $C_{40}$ , а топочных мазутов —  $C_{14}$ — $C_{38}$  и т. д.

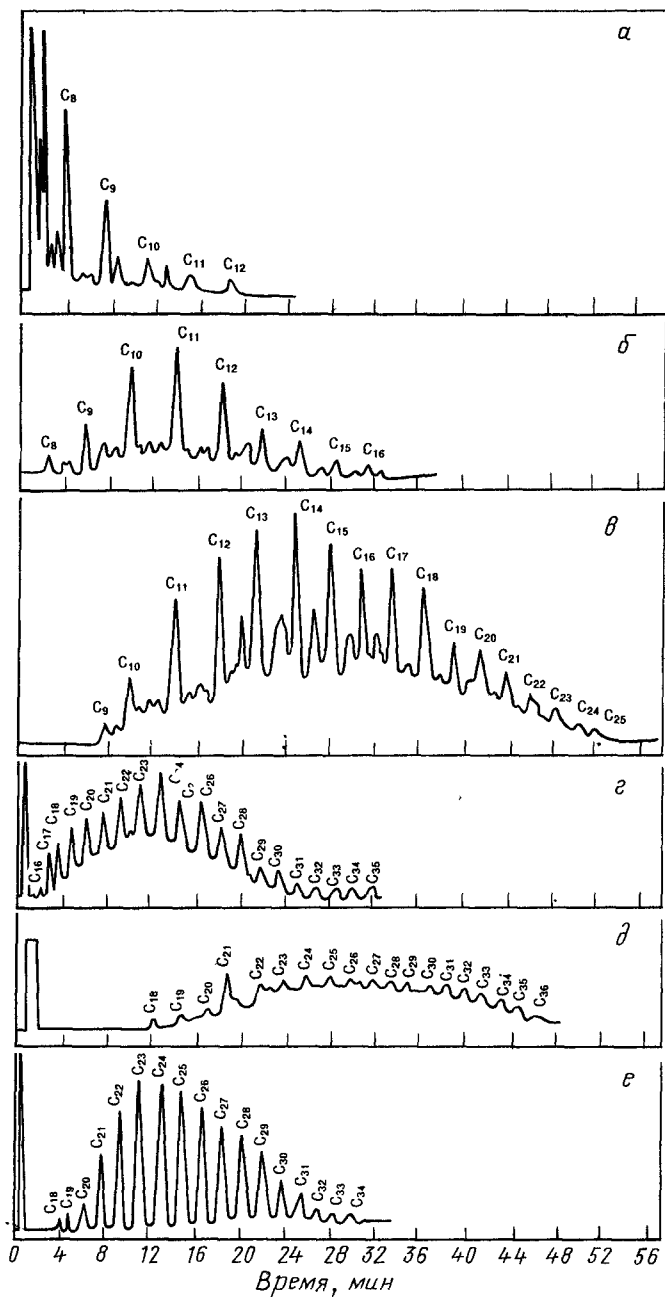


Рис. II.45. Хроматограммы стандартных образцов нефтепродуктов:

*а* — бензин А-76 (программирование температуры от 45 до 150 °С), *б* — керосин осветительный (от 60 до 200 °С), *в* — дизельное топливо марки «Л» (от 60 до 250 °С), *г* — консистентная смазка (от 200 до 330 °С), *д* — топочный мазут марки «40» (от 150 до 330 °С), *е* — технический парафин (от 200 до 330 °С).

Используя полученные данные, определяли типы нефтепродуктов путем сопоставления хроматограмм экстрактов природных и сточных вод с хроматограммами нефтепродуктов из классификационной картотеки. При установлении типа (марки) нефтепродукта руководствовались соответствием состава по *n*-парафинам, а также совпадением индивидуальных признаков хроматограмм («отпечатков пальцев»). Такими признаками были соотношение высот пиков *n*-парафинов, особенности геометрической формы группы пиков изопарафинов, нафтеновых и ароматических углеводородов, проявляющихся на хроматограмме между пиками *n*-парафинов. На рис. II.46 проиллюстрировано

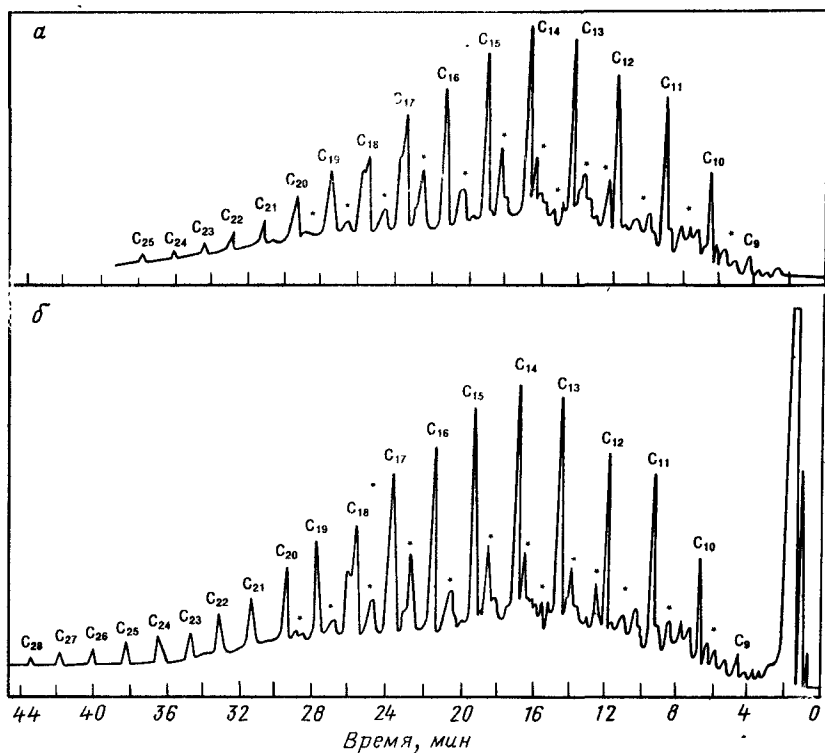


Рис. II.46. Хроматограммы стандартного образца дизельного топлива марки «Л» (*а*) и гексанового экстракта пробы сточной воды, содержащей дизельное топливо марки «Л» (*б*)

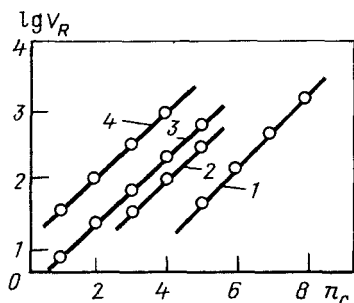


Рис. П 47 Зависимость логарифма исправленного объема удерживания от  $n_C$  в молекулах *n*-парафинов (1), кетонов (2), *n*-спиртов (3) и карбоновых кислот (4)

выявление в сточной воде наличия «дизельного топлива летнего». Хроматограммы получены на колонке с OV-101 при программировании температуры от 60 до 250 °С со скоростью 5 град/мин. Звездочками отмечены индивидуальные признаки, характерные для данного типа нефтепродукта.

**Использование корреляционных зависимостей.** При допущении, что теплота адсорбции пропорциональна числу атомов углерода  $n_C$  в молекуле гомолога, а изменение энтропии не зависит от  $n_C$ , теория хроматографии дает линейное соотношение между логарифмом исправленного объема удерживания ( $V_R$ ) и  $n_C$  в пределах одного гомологического ряда:

$$\ln V_R = a + b n_C,$$

где  $a$  и  $b$  — константы, зависящие от гомологического ряда, характеристик сорбента и температуры колонки

Пример таких зависимостей для соединений четырех классов на заполненной порпаком Q колонке при 180 °С приведен на рис. П.47 [9].

Вместо  $n_C$  в уравнении может быть использован другой параметр, закономерно изменяющийся в пределах данного ряда, например молекулярная масса, температура кипения, отношение абсолютной температуры кипения веществ к абсолютной температуре колонки, общая поляризуемость молекул.

Многочисленные экспериментальные результаты [9] свидетельствуют о том, что линейность подобных зависимостей строго не выполняется для первых членов ряда ( $n_C \leq 5-7$ ), а также для любой последовательности гомологов, включающей более 7—8 членов.

Возможно также использование зависимостей иных типов, например

$$(T_R - T_0) = f(n_C),$$

где  $T_R$  — температура удерживания в условиях температурного программирования;  $T_0$  — начальная температура колонки.

Такая зависимость показана на рис. II.48 [53] для гомологического ряда свободных жирных кислот. Измерения  $T_R$  выполняли на стеклянных колонках длиной 1,5 м, заполненных хроматоном  $N=AW=DMCS$  с термически модифицированным полиэтиленгликолем 20М (термо-ПЭГом) в режиме программирования температуры от 60 до 260 °С со скоростью 4 град/мин.

Если анализируемая смесь содержит компоненты нескольких гомологических рядов, то указанным методом без получения дополнительной информации идентификацию провести нельзя. Один из путей решения этой проблемы — использование зависимостей между параметрами удерживания, измеренными на двух различных неподвижных фазах. В этом случае зависимости

$$\ln V_{RH\Phi 1} = a' \ln V_{RH\Phi 2} + b'_{1,2}$$

представляют собой параллельные прямые (коэффициент  $a'$  постоянен для всех гомологических рядов для данной пары неподвижных фаз НФ1 и НФ2), отсекающие на оси ординат отрезки ( $b'_{1,2}$ ), размер которых характерен для соответствующего гомологического ряда (см. рис. II.49) [54].

Другой возможный путь получения дополнительной информации — проведение группового химического анализа веществ

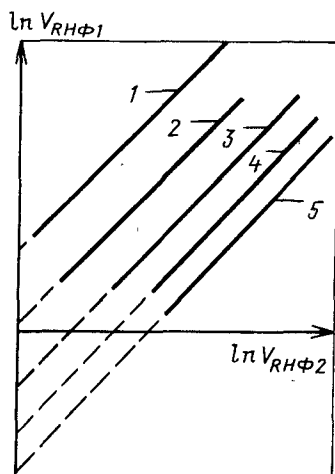
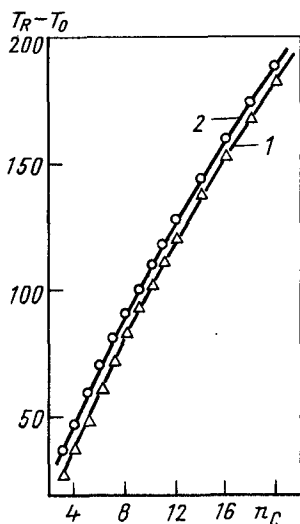


Рис. II.48. Зависимость исправленной температуры удерживания от  $n_c$  в молекулах свободных жирных кислот  $C_3 - C_{20}$  при начальном содержании полиэтиленгликоля 20 М в термо-ПЭГ 3% (1) и 10% (2)

Рис. II.49. Зависимость между логарифмами исправленных объемов удерживания соединений различных классов на двух неподвижных фазах:

1 — n-парафины; 2 — ароматические углеводороды; 3 — n-спирты; 4 — кетоны, 5 — алкилиодиды

после их разделения в хроматографической колонке. Тем или иным способом вещества каждой хроматографической полосы проходят через зону, в которой имеется набор специфических реагентов. По изменению одного из этих реагентов судят о функциональной группе данного компонента. Совокупность сведений, полученных с помощью качественных реакций, с данными измерений объемов удерживания позволяет осуществлять систематическую идентификацию компонентов смесей соединений различных классов.

В литературе опубликован обширный материал [54, 55] по другим подходам к проблеме идентификации. Эти подходы основаны на расчетных методах (индексы молекулярной связанности и различных порядков, гомоморфный фактор), различного рода инкрементах индексов удерживания (температурные, метиленовые, фазовые, замещения), универсальных корреляционных зависимостях для дифференциальной молярной свободной энергии растворения. Многие из этих подходов представляют значительный интерес и являются мощным средством исследования межмолекулярных взаимодействий в хроматографических системах, а в сочетании с ЭВМ позволяют осуществлять нестандартную идентификацию самых сложных объектов. Однако в методическом плане для массового пользователя эти подходы остаются достаточно сложными, поэтому мы вынуждены отослать интересующегося читателя к специальной литературе.

**Реакционная газовая хроматография.** Сочетание химических и хроматографических методов исследования с получением в результате химических реакций соединений, заметно отличающихся по параметрам удерживания от соединений, присутствующих в исходной пробе, позволяет осуществлять качественный анализ весьма сложных объектов. Химические реакции (обмена, гидрирования, дегидрирования, дегидратации, декарбоксилирования, гидрогенолиза, этерификации и др.) могут осуществляться в различных звеньях хроматографической системы до колонки, после колонки или непосредственно в колонке.

Простейший вариант реакционной газовой хроматографии — групповой химический анализ веществ после их разделения в колонке — описан в предыдущем разделе. Широкое распространение получила методика вычитания пиков, основанная на селективном образовании одним или несколькими компонентами анализируемой смеси нелетучих соединений с реагентом (сорбентом), помещенным в реактор до колонки или между колонкой и детектором. Механизм вычитания может быть основан на необратимо протекающих процессах либо химического взаимодействия с реагентом, либо сорбции поглотителем. Сопоставление хроматограмм, записанных до и после удаления из исходной анализируемой смеси тех или иных компонентов, позволяет провести их групповую идентификацию. Метод вычитания как стадию



подготовки пробы к анализу при определении примесей используют и для избирательного удаления растворителя, основного вещества или компонентов, перекрывающих пики определяемых соединений.

Еще одним вариантом реакционной газовой хроматографии является методика сдвига пиков, которая заключается в превращении в результате необратимо протекающей химической реакции некоторых компонентов разделяемой смеси в производные с иными параметрами удерживания по сравнению с исходными компонентами. Выводы о качественном составе смеси делают на основе сопоставления двух хроматограмм: исходной смеси и той же смеси после химических превращений.

Самостоятельной областью реакционной газовой хроматографии является пиролитическая газовая хроматография, которая сочетает в едином методе процессы пиролиза вещества и хроматографического определения продуктов его термического разложения. Как правило, методом пиролитической газовой хроматографии исследуют нелетучие вещества, в частности полимеры, для которых нельзя использовать обычные варианты газохроматографического анализа. Пиролиз осуществляют в динамическом режиме с направлением потока газа-носителя в колонку либо непосредственно, либо через кран-дозатор. Хроматограмму продуктов пиролиза называют обычно пирограммой. Описаны многочисленные варианты конструкций пиролизеров (микрореакторы, по точкам Кюри, с электрической спиралью, с элементом, нагреваемым током высокой частоты и др.), каждая из которых обладает своими преимуществами и недостатками.

Экспрессное получение достоверной информации из пирограммы может быть обеспечено сочетанием метода с современной вычислительной техникой.

**Использование селективных методов детектирования.** В газовой хроматографии наибольшее распространение получили детекторы двух типов: по теплопроводности и пламенно-ионизационный. Оба они считаются детекторами универсальными. Их сочетание с селективными детекторами (электронозахватным, пламенно-фотометрическим, термоионным и др.) является мощным средством групповой идентификации компонентов смесей неизвестного состава. При записи с использованием нескольких детекторов хроматограмм разделенной на одной и той же колонке анализируемой смеси при условии попадания в каждый детектор равных количеств вещества на хроматограммах в зависимости от природы вещества и механизма работы детектора регистрируются различные по размерам пики. Отношение сигналов детекторов к данному веществу и является критерием отнесения последнего к тому или иному классу химических соединений.

В простейшем варианте на стандартном оборудовании этот метод количественного анализа реализуется путем записи хро-

матограмм в последовательных экспериментах сначала на одном, а затем на другом типе детекторов. Необходимое условие — учет вводимого объема пробы.

В более сложных схемах (так называемые мультidetекторные схемы) возможны различные варианты сочетания последовательного и параллельного размещения детекторов после колонки относительно друг друга. При последовательном соединении все детекторы, за исключением последнего, должны быть недеструктивными (например, по теплопроводности, по плотности, электронозахватный). При параллельном соединении необходимо учитывать количество вещества, попадающее в каждый детектор и определяемое делением потока газа-носителя. Важно также не допустить, чтобы регистрируемые сигналы выходили за пределы линейного динамического диапазона каждого детектора.

## ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Жидкостная хроматография (ЖХ) — наиболее интенсивно развивающийся инструментальный вариант хроматографии, используемый для исследования и анализа различных простых и сложных смесей тяжелых органических и биологически активных соединений, а также полимерных композиций. Ее успехи обусловлены созданием новых типов сорбционных материалов, обеспечивающих реализацию разнообразных видов межмолекулярных взаимодействий, освоением методов приготовления высокоэффективных хроматографических колонок и развитием систем инструментального обеспечения всего процесса, включая детектирование и обработку результатов измерений.

В отличие от газовой хроматографии в ЖХ существенно большее значение имеет природа подвижной фазы, благодаря чему комбинации даже ограниченного числа сорбентов и неограниченного числа различных по составу подвижных фаз и их композиций вплоть до четырехкомпонентных позволяют решать разнообразные встречающиеся задачи.

Классическую жидкостную колоночную хроматографию при низких давлениях и неоднородных сорбентах используют в основном для предварительного разделения. В подавляющем большинстве случаев применяют жидкостную хроматографию высокой эффективности (ВЭЖХ) с высокими давлениями, обуславливающими высокие скорости разделения, и сорбентами высокой степени однородности.

### Глава I

## СОРБЕНТЫ

До недавнего времени было принято считать, что число сорбентов для ВЭЖХ сравнительно невелико, особенно в сопоставлении с газовой хроматографией, и задачи разделения в большей мере решаются правильным выбором подвижной фазы. Однако в последнее время число типов сорбентов для всех вариантов ВЭЖХ существенно возросло. Наряду с сорбентами универсального типа появились сорбенты специального назначения, дающие возможность успешно решать специфические задачи, например разделение белков, определение лекарственных препаратов в сыворотке, разделение *D*- и *L*-изомеров и т. д.

Наиболее существенными особенностями сорбентов, введенных в практику ВЭЖХ, являются: преимущественное использование микрочастиц диаметром  $d_p = 3-10$  мкм как нерегулярной, так и сферической формы; повышенная степень однородности частиц (около 90% основной фракции); повышенная степень однородности геометрической внутренней поверхности частиц и возможность ее регулирования в широких пределах (диаметр пор  $d_n = 6-10\,000$  нм, удельная площадь поверхности  $S_{уд} = 10-600$  м<sup>2</sup>/г, удельный объем пор  $V_{уд} = 0,3-1,3$  см<sup>3</sup>/г); повышенная степень химической однородности и возможность регулирования в широких пределах емкости сорбционных материалов; повышенная прочность.

Все эти факторы позволяют работать при высоких давлениях, уменьшают пути внешней и внутренней диффузии, ускоряют массообмен подвижной фазы, увеличивают полноту протекания ионообменных реакций, ион-парных и других взаимодействий, диффузию в пограничных областях и т. д.

По структуре и характеру протекания диффузионных процессов в порах сорбенты разделяют на два основных типа: поверхностно-пористые и объемно-пористые. Особенности протекающих в них процессов показаны на рис. III.1.

Природа активных функциональных групп на поверхности сорбента определяет селективность процесса разделения, а размер частиц, их фракционный состав (близость к монодисперсному распределению) и характер упаковки определяют эффективность процесса разделения. Использование поверхностно-пористых сорбентов дало возможность заметно повысить эффективность разделения ЖХ, однако в последние годы сорбенты этого типа применяют редко. Переход к объемно-пористым сорбентам с малыми размерами частиц (3—10 мкм) позволил при большей емкости сделать пути диффузии в порах сорбентов обоих типов сопоставимо малыми и существенно повысить эффективность колонок для ВЭЖХ.

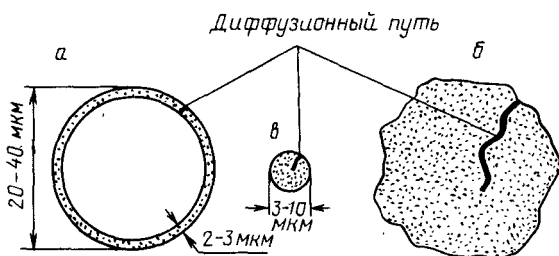


Рис. III.1. Типы сорбентов для ВЭЖХ:

а — поверхностно-пористый; б — объемно-пористый; в — макропористая микрочастица

Таблица III 1 Параметры сорбентов и колонок

Параметр	Поверхностно пористые	Объемно пористые
$Q_p$ , мкм	30—40	3—10
$S_{уд}$ , м <sup>2</sup> /г	10—15	100—600
Емкость сорбента $E$ , мг/г	0,05—0,1	1—5
Типичный диаметр колонки, мм	2—5	1,46
Типичная длина колонки, см	50—100	5—25
Перепад давления, Па	2	20
Оптимальное значение ВЭТТ, мм	0,2—0,4	0,1—0,01

Параметры поверхностно-пористых и объемно-пористых сорбентов для ВЭЖХ и заполняемых ими колонок приведены в табл. III.1.

По химической природе сорбенты для ЖХ можно разделить на три группы: неорганические (силикагель, оксид алюминия); органические (на основе полимеров гелевой и макропористой структуры), смешанные (неорганические, капсулированные полимерным слоем, с привитыми ионогенными группами) и неорганические с привитыми органическими функциональными группами).

В результате реализации большого числа возможных композиций сорбенты для ВЭЖХ можно разнообразить, но во всех случаях предполагается наличие достаточно жесткой матрицы, выдерживающей высокие рабочие давления в колонке без ухудшения структурных характеристик.

В начальный период развития в ЖХ использовали сорбенты, подобные сорбентам для газовой хроматографии: частицы носителя с механически нанесенной пленкой неподвижной фазы, которыми заполняли колонки длиной 1—2 м. Такие сорбенты имели переменные характеристики удерживания и время их использования было невелико. При синтезе и модификации сорбентов для ВЭЖХ химические взаимодействия предпочтительней, чем физические, поскольку они позволяют добиться существенно большей устойчивости получаемых материалов к воздействию внешней среды. Используют обычно сорбенты, в которых слои закреплены на подложке (носителе) — «вещество на сорбенте». Часто они представляют собой новый материал со свойствами, которыми не обладал ни сорбент, ни сорбированные или привитые вещества.

### 1.1. СОРБЕНТЫ ДЛЯ СИТОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Разделение по этому варианту хроматографии, основными объектами которого являются преимущественно крупные молекулы, целиком основано на ситовом эффекте, поэтому необхо-

димы сорбционные материалы с большим разнообразием структурных характеристик. Традиционно первыми сорбентами для таких разделений были полистирольные гели. В настоящее время для ситовой хроматографии используют сорбенты трех групп: полужесткие гели, преимущественно на основе сополимеров СТ и ДВБ, силикагели и пористые стекла. В некоторых случаях поверхность силикагелей обработана хлорсиланами. Перечень основных материалов для ситовой хроматографии при-

Таблица III.2. Основные сорбенты для ситовой хроматографии

Сорбент	Основа	$d_p$ , нм	M
Аквагель (НВ)*	Полиакриламид	—	$1 \cdot 10^2 - 1 \cdot 10^5$
Биогель (В)*	—»—	—	$1 \cdot 10^2 - 2 \cdot 10^3$
Лихросфер (В)	Силикагель	12,5	$(0,2-50) \cdot 10^3$
		50	$(0,2-50) \cdot 10^4$
		100	$(5-20) \cdot 10^5$
Сефадекс Н-25 (В)	Полисахарид		$1 \cdot 10^2 - 5 \cdot 10^3$
Сефадекс Н-20 (НВ)	—»—		$1 \cdot 10^2 - 4 \cdot 10^3$
Сорбент (В)	Пористое стекло		$(1-8) \cdot 10^3$
		10	$(1-30) \cdot 10^3$
		25	$(2,5-125) \cdot 10^3$
		55	$(1,1-35) \cdot 10^4$
		150	$(1-10) \cdot 10^5$
		250	$(2-15) \cdot 10^5$
Сорбент TSK (НВ)	СТ—ДВБ	4	$(0,5-10) \cdot 10^2$
		25	$(0,5-60) \cdot 10^2$
		150	$(1-60) \cdot 10^3$
		1000	$(0,5-40) \cdot 10^4$
		10 000	$(0,2-400) \cdot 10^4$
Сорбент TSK (В)	Силикагель	13	$2 \cdot 10^4$
		24	$4 \cdot 10^4$
		450	$2 \cdot 10^5$
μ-Стирагель $10 \pm 1$ (НВ)	СТ—ДВБ	10	$7 \cdot 10^2$
		50	$(5-100) \cdot 10^2$
		1000	$(1-20) \cdot 10^3$
		10 000	$(1-20) \cdot 10^4$
		10 000	$(1-20) \cdot 10^5$
		100 000	$(1-20) \cdot 10^6$
μ-Сферогель $10 \pm 1$ (НВ)	—»—	5	$2 \cdot 10^2$
		10	$(1-50) \cdot 10^2$
		50	$(5-10) \cdot 10^3$
		100	$(1-50) \cdot 10^4$
		10 000	$(1-50) \cdot 10^4$
		10 000	$(1-50) \cdot 10^5$
		100 000	$1 \cdot 10^6$
Тойоперл НВ-40, НВ-50, НВ-55, НВ-65, НВ-75	СТ—ДВБ	—	$1 \cdot 10^2 - 1 \cdot 10^8$
Цеодекс А-800, К-800, К-2000	СТ	9 типов	$1,5 \cdot 10^3 - 4 \cdot 10^6$

\* В — водная среда, НВ — неводная среда

веден в табл. III.2. Для получения сорбентов этого типа используют все известные приемы получения необходимых структурных характеристик.

## 1.2. СОРБЕНТЫ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ВЭЖХ

Основным адсорбентом для молекулярной ВЭЖХ является силикагель. Он же во многих случаях является матрицей при создании модифицированных сорбентов. Оксид алюминия применяют в ВЭЖХ достаточно редко, главным образом при разделении веществ основной природы, сильно адсорбирующихся на кислой поверхности силикагеля. Кроме того,  $Al_2O_3$  можно использовать в средах с высокими рН. Характеристики некоторых сорбентов на основе  $Al_2O_3$  приведены в табл. III.3.

Таблица III.3. Свойства сорбентов на основе  $Al_2O_3$

Сорбент	$S_{уд}, м^2/г$	$d_n, нм$	$d_p, мкм$
Сферисорб	90	13	5; 10
Алюсорб 075	75	8—10	5; 7, 5; 10
Алюсорб 200	200	8—10	5; 7, 5; 10

Наибольшее значение в качестве сорбента для ВЭЖХ имеет силикагель, используемый не только как адсорбент, но и как

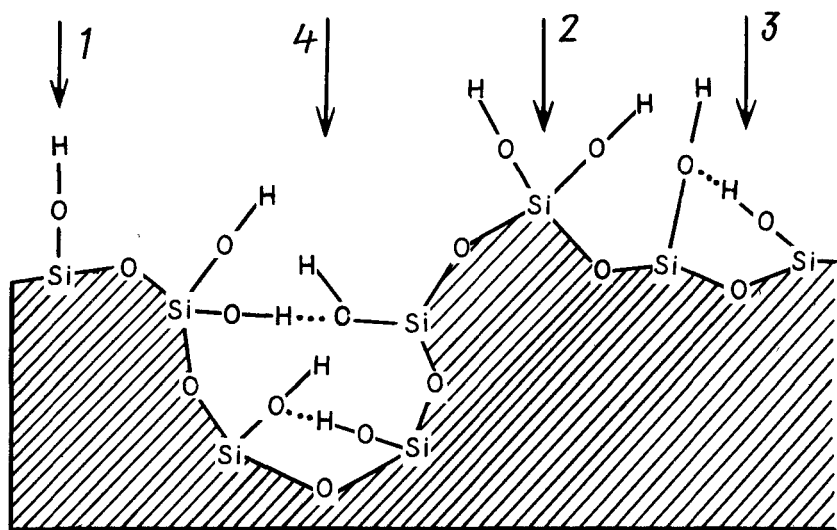


Рис. III.2. Схемы покрытия поверхности силикагеля различными типами силанольных групп

матрица для синтеза на его основе большого числа разнообразных модифицированных сорбентов.

Следует отметить две особенности силикагелевых сорбентов, важные при их использовании в ВЭЖХ: наличие на поверхности трех типов силанольных групп (рис. III.2) и полимолекулярного слоя воды. Состояние водных слоев на поверхности силикагеля:

3-й слой слабо адсорбированной воды, удаляется при 18—70 °С сухим растворителем, процесс обратимый;

2-й слой слабо адсорбированной воды, удаляется при 100—120 °С сухим растворителем, процесс обратимый;

1-й слой сильно связанной за счет водородных связей воды, удаляется при 200—650 °С растворителем, процесс обратимый; силанольные группы теряют воду, превращаясь в силоксановые при 450—1100 °С, процесс необратимый.

Широко распространено мнение, что большинство фирм используют лишь небольшое число типов силикагеля, поставляемого ограниченным кругом производителей. Такая точка зрения ошибочна. В табл. III.4 приведен перечень силикагелей для

Таблица III.4. Свойства силикагелей, используемых в ВЭЖХ

Сорбент	$S_{уд}$ , м <sup>2</sup> /г	$d_n$ , нм	$V_{уд}$ , см <sup>3</sup> /г	pH водной суспензии	Форма частиц
Адсорбсфер	200	8	—	—	Сферическая
	350	6	—	—	—»—
Армсил	300—360	10	0,9	6,5—7,5	Нерегулярная
Армсфер	300	10	0,9	6,5—7,5	Сферическая
Бондапак	300	10	—	—	Нерегулярная
Видак	100	30	—	—	Сферическая
	500	8	—	—	—»—
Гиперсил	170	10; 30	0,6—0,7	9,0	—»—
Динамакс 60 А	350	6	—	—	Нерегулярная
150 А	—	15	—	—	—»—
300 А	—	30	—	—	Сферическая
Зорбакс	350	7	0,5	3,9	—»—
Лихросорб 60 и 100	320	6; 10	1,2	7,0	Нерегулярная
Лихросфер 100	350	10	1,2	—	Сферическая
Макросфер	300—500	6—400	—	—	Нерегулярная
Матрекс 60 и 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	—	—	—»—
Партсил	350	8,5	—	7	Нерегулярная
Полигосил 60, 100	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	—	Сферическая
Рсил	550	6	—	7,0	Нерегулярная



Сорбент	$S_{уд}$ , м <sup>2</sup> /г	$d_n$ , нм	$V_{уд}$ , см <sup>3</sup> /г	рН водной суспензии	Форма частиц
Сепарон	450	15	0,8	—	Нерегулярная
Силасорб 300 и 600	300—500	7,5; 10	—	—	Сферическая
	300—550	7,5; 10	0,7—1,0	—	Нерегулярная
Силикагель КСК	250—350	12—15	1,0—1,25	—	—»—
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	—	Сферическая
Эконосфер	200—250	8—10	—	—	—»—
Эконосил	450	6	—	—	—»—
Эрбасил	300	5	0,1	—	Нерегулярная

ВЭЖХ, производимых различными фирмами, и их основные свойства. Из этих данных видно, что большая часть сорбентов имеет достаточно близкие характеристики:  $d_n=6-12$  нм,  $S_{уд}=200-550$  м<sup>2</sup>/г,  $V_{уд}=0,7-1,2$  см<sup>3</sup>/г. Форма частиц большинства представленных в таблице силикагелей — сферическая. Такая форма обуславливает меньшее гидравлическое сопротивление сорбента и способствует оптимизации структуры слоя, кроме того, освоенная технология сферических силикагелей обеспечивает получение более однородных по размерам частиц сорбента, что увеличивает выход целевой фракции. Указываемый  $d_n$  (5; 7; 10 мкм) имеют обычно около 80—90% частиц. На рис. III.3 представлено распределение пор и частиц по размерам силикагелей эрбасил и лихросорб. Видна значительная разница в степени однородности, в существенной мере определяющей эффективность колонок. Лишь несколько фирм производят силикагели с существенным разнообразием свойств, позволяющим иметь весь набор структурных характеристик

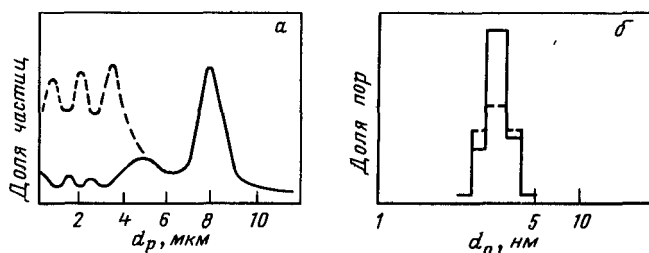


Рис. III.3. Распределение частиц (а) и пор (б) по размерам для силикагелей эрбасил (сплошная) и лихросорб (пунктирная)

силикагеля. К таким сорбентам относится группа под названием нуклеосил, характеристики которых приведены в табл. III.5. Нуклеосил является сорбентом объемно-пористого типа с частицами сферической формы.

Таблица III.5. Свойства нуклеосила  $d_p = 3,5 \pm 1,5$ ;  $7 \pm 1,5$  и  $10 \pm 1,5$  мкм

Сорбент	$d_p$ , нм	$V_{уд}$ , см <sup>3</sup> /г	$S_{уд}$ , м <sup>2</sup> /г	Сорбент	$d_p$ , нм	$V_{уд}$ , см <sup>3</sup> /г	$S_{уд}$ , м <sup>2</sup> /г
Нуклеосил-50	5	0,8	500	Нуклеосил-500	50	0,9	35
Нуклеосил-100	10	1,0	350	Нуклеосил-1000	100	0,75	25
Нуклеосил-120	12	0,7	200	Нуклеосил-4000	400	0,7	10
Нуклеосил-300	30	1,0	100				

К силикагелевым сорбентам со свойствами, аналогичными свойствам нуклеосилов, относят макросфер и синхропак, которые также представляют собой набор частиц силикагеля с  $d_p = 10—400$  нм. Наличие большого числа силикагелей для ВЭЖХ с близкими характеристиками нельзя расценивать только как достижение, поскольку свойства перечисленных силикагелей (см. табл. III.4) даже при формально одинаковых характеристиках не являются полностью идентичными, особенно после их модификации путем химической прививки различных функциональных групп.

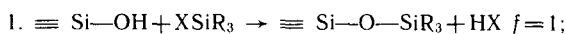
Силикагель является основой большинства получаемых сорбционных материалов для ВЭЖХ, что обусловлено детальной изученностью силикагеля как сорбента, мягкостью его гидроксильного покрова и возможностью варьировать размеры пор и удельную площадь поверхности. Разработанные методы химического модифицирования позволяют закрепить на поверхности силикагеля практически любой класс химических соединений, любую функциональную группу или их сочетание. Оказалось, что наибольшая прочность привитого слоя обеспечивается при использовании кремнийорганических модификаторов в основном за счет ковалентного закрепления органических соединений, обусловленного в первую очередь наличием на поверхности силикагеля силанольных групп  $\equiv Si-OH$ , предельное содержание которых составляет  $4,6 \text{ нм}^{-2}$ .

Поверхность кремнезёмов обычно покрыта полимолекулярным слоем физически адсорбированной воды, которая препятствует модифицированию поверхности. Кроме того, поверхность силикагеля геометрически и энергетически неоднородна, в связи с чем полностью однородное распределение на ней привитых молекул затруднено. Для получения максимальной степени покрытия предпочитают использовать жесткие условия синтеза и заведомо достаточное для завершения реакции время.

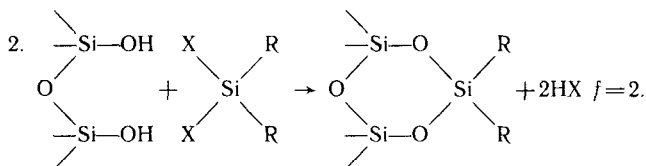
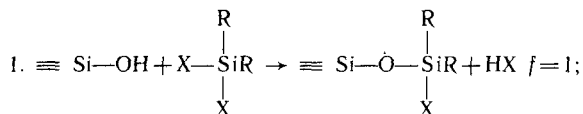
Наиболее вероятный механизм реакций взаимодействия си-

ликагеля с модификатором различной функциональности следующий:

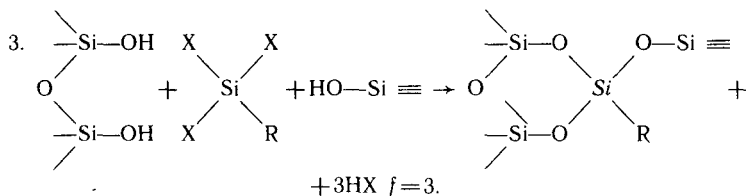
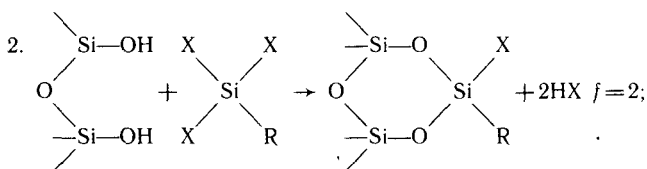
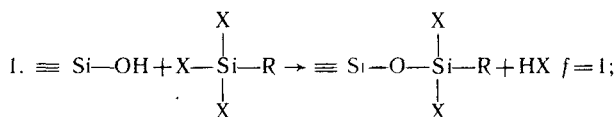
с монофункциональным модификатором



с дифункциональным модификатором



с трифункциональным модификатором



R — алкил, X — галоген.

Стехиометрия реакций силикагеля с различными силанами может быть выражена  $f$ -фактором: отношением числа молей прореагировавших ОН-групп к числу молей вступившего в реакцию модификатора. Значение  $f=3$  невозможно по стерическим соображениям. Непрореагировавшие силанольные группы, оказывающие отрицательное влияние на свойства полученного сорбента, нейтрализуются обработкой различными силанами. В целом обеспечивается плотность прививки  $1,1\text{--}2,3\text{ нм}^{-2}$ .

Химическими методами прививки получают следующие основные типы модифицированных сорбентов на основе силикагеля с привитыми группами по связи  $\text{—Si—C—}$  (табл. III.6).

Таблица III 6 Типы модифицированных сорбентов с привитыми группами

Тип сорбента	Привитая группа	Тип сорбента	Привитая группа
$\text{C}_2\text{—C}_8$ (MOS, RP-8)	Алкильная ( $\text{C}_2\text{—C}_8$ )	$\text{N}(\text{CH}_3)_2$	Диметиламиногруппа
$\text{C}_{18}$ (ODS, RP)	Октадецильная	$\text{OH}(\text{Diol})$	ОН-группа
$\text{C}_6\text{—H}_5$	Фенильная	$\text{S}_\text{A}$	Сульфогруппа $\text{SO}_3\text{Na}$ (сильноокислотный катионообменник, $E \approx 1$ экв/г)
$\text{NO}_2$	Нитрогруппа	$\text{S}_\text{B}$	$\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$ (сильноосновной анионообменник, $E \approx 1$ экв/г)
$\text{NH}_2$ (APS)	Аминогруппа		

Эти типы сорбентов предлагает практически каждая фирма. Кроме того, созданы специализированные сорбенты для разделения конкретных групп соединений.

Сорбенты с привитыми фазами характеризуются параметрами, определяющими удерживание и селективность. Среди таких параметров наиболее важными являются тип и концентрация привитого органического модификатора и концентрация оставшихся на поверхности силикагеля силанольных групп. Для приготовления привитой фазы поверхность исходного силикагеля химически обрабатывают так, чтобы обеспечить максимальную концентрацию силанольных групп. Типичное значение  $C_{\text{ОН}}$  достигает  $7\text{--}9\text{ мкмоль/м}^2$ , что соответствует  $\approx 4\text{--}5$  силанольным группам на  $1\text{ нм}^2$  поверхности силикагеля. В случае монофункциональных реагентов степень конверсии поверхностных силанольных групп  $X_{\text{ОН}}$ , определяемая соотношением  $X_{\text{ОН}} = C_{\text{ОН}} = C/C_{\text{ОН}}$ , колеблется от 10 до 60%. Верхний предел определяется размером молекул органического модификатора и их способностью прививаться к силанольным группам. Наличие остаточных

силанольных групп желательно, так как они обеспечивают хорошую смачиваемость поверхности, однако в ряде случаев эти группы закрываются в результате дополнительной обработки хлорсиланами для снижения нежелательной адсорбции (endcapping). Данные о степени покрытия поверхности сорбента функциональными группами малочисленны (табл. III.7).

Таблица III.7. Степень покрытия поверхности сорбентов водородами  $C_8$  и  $C_{18}$

Сорбент	Степень покрытия, %
Силикагель $C_8$ :	
Эконосфер	5
Гиперсил	7
Росил, эконосил	9—10
Силикагель $C_{18}$ :	
Видак TP	9
Партисил, гиперсил, верзапак	10
Адсорбосфер, сферисорб	11—12
Эконосил, росил, партисил	15—16
Видак H, адсорбосфер H	18—20

В литературе опубликовано недостаточно конкретных данных по изменению площади сорбентов  $S_{уд}$ , размера пор и их распределения после прививки функциональных групп.

Ниже приведены значения  $S_{уд}$  ликросорба после прививки алкильной цепи:

Микросорб	...	60	100	R-2	R-8	R-18	Diol	NH <sub>2</sub>
$S_{уд}$ , м <sup>2</sup> /г	...	550	420	320	250	150	250	250

Изменение  $S_{уд}$  тем больше, чем длиннее привитая алкильная цепь.

Во многих случаях наблюдается различие в свойствах одной и той же группы модифицированных сорбентов, произведенных разными фирмами, или между партиями сорбентов, полученных от одной фирмы, но в разное время. Причинами такой невоспроизводимости являются различия как в свойствах исходного силикагеля, так и в условиях модифицирования.

### 1.3. СОРБЕНТЫ ДЛЯ ХЕМОСОРБЦИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

В эту группу входят сорбенты для ионообменной хроматографии, аминокислотного анализа, ионной хроматографии, разделения энантиомеров и для других специфических задач. Имеющаяся информация об этих сорбентах носит весьма поверхностный характер. В качестве матрицы в этой группе сорбентов используют как силикагель с полимерным покрытием, так и макропористые полимеры с привитыми ионогенными группами.

### 1.3.1. Сорбенты для ионообменной хроматографии

Методы синтеза большинства сорбентов для аналитической ионообменной хроматографии очень сходны с теми, которые применяют при прививке функциональных групп к силикагелям. Монохлор- или моноалкоксизамещенные силаны взаимодействуют с силикагелем по силоксановым связям, образуя мономерный слой органических групп. Ионогенные функциональные группы вводят в органическую основу по соответствующей реакции. Обычно полимерные слои обеспечивают более низкую эффективность, поскольку закрывают часть развитой внутренней поверхности пор. Вместе с тем сорбенты этого типа имеют большую емкость. В табл. III.8 сопоставлены свойства различных сорбентов для ионообменной хроматографии.

Таблица III.8. Свойства сорбентов для ионообменной хроматографии

Основа сорбента	$d_p$ , мкм	Ионообмен- ная емкость $E$ , экв/г	Форма частиц	Эффектив- ность $N$	Предел рН	Скорость регенерации
Поверхностно- пористый сили- кагель	30—40	0,01—0,1	Сфериче- ская	Средняя	2—12	Высокая
Объемно-пори- стый силикагель	5—10	0,5—2	Сфериче- ская, нере- гулярная	Высокая	2—7,5	Умеренная
СТ—ДВБ*	7—10	3—5	Сфериче- ская	Выше средней	0—12 (анион) 0—14 (катион)	Низкая

\* Стирол — дивинилбензол

Сорбенты на основе сополимеров СТ-ДВБ обычно содержат 6—30% сшиваемого агента. По сравнению с сорбентами на основе силикагеля они имеют в 5—10 раз большую ионообменную емкость (3—5 экв/г), могут работать при более высоких значениях рН, имеют большой срок годности. Вместе с тем они обеспечивают несколько меньшую эффективность.

Обычно ионообменники содержат сульфонаты (сильные катионообменные группы), карбоксилаты (слабые катионообменные группы), тетраалкиламмониевый ион (сильные анионообменные группы) или амины (слабые анионообменные группы). Прямая реакция ароматических колец с олеумом или хлорсульфоновой кислотой или хлорметилирование хлорметиловым эфиром в присутствии  $ZnCl_2$  ( $AlCl_3$ ) являются наиболее распространенными реакциями для введения сульфонатных или тетраалкиламмониевых групп.

В аналитической ионообменной хроматографии преимущест-

венно используют сорбенты на основе силикагеля (табл. III.9). Из практики почти исчезли поверхностно-пористые сорбенты. Для обозначения сильных ионообменников применяют символ S (strong), слабых W (weak). О части включенных в табл. III.9 сорбентов нет никаких сведений, кроме самих названий.

Таблица III.9. Некоторые сорбенты для ионообменной хроматографии

Сорбент	Основа	Функциональная группа	Примечание
Адсорбосфер АХ СХ	Сил —»—	Сульфогруппа Аммониевая группа	$d_p=5$ мкм $d_p=5$ и 10 мкм
Альтекс ОА-1000	СТ — ДВБ	Сульфогруппа	1000 разделений без потери разрешения
Ионопак	СТ — ДВБ	—»—	100 000 т/м
Макросфер 300 АХ	Сил	Диэтиламиноэтан	$d_p=7$ мкм
300 СХ		Карбоксикислота	$d_p=7$ мкм
300		Сульфокислота	$d_p=6,5$ мкм
300		Аммониевая группа	$d_p=6,5$ мкм
НІС	Полиамид	Пропил, гидроксипропил, метил, пентил	—
Макросфер аминоксидол-карбокси-	Сил (30, 50, 100 нм)	Аминогруппа	Используется в аффинной хроматографии
Нуклеоген ДЕАЕ	Сил 6, 50, 400	Эпоксигруппа Диольная группа Карбоксикислота	— — —
Нуклеосил А	Сил (нуклеосил 100)	Сульфогруппа	Используется для аминокислотного анализа
В	То же	Аммониевая группа	—
II	—»—	Диметиламиногруппа	$d_p=5$ и 10 мкм $E=1$ экв/г Слабоосновной
Синхропак СМ-300	Сил (синхропак, 30 нм)	Карбоксикислота	$d_p=6,5$ мкм
АХ-300	То же	Сульфогруппа	—
Сорбент НFAAR	СТ — ДВБ	Аммониевая группа	$d_p=6$ мкм
Сферисорб АХ	Сил	—	pH 1—14, $d_p=6$ мкм
		Аммониевая группа	Эффективность 70 000 т. т/м

### 1.3.2. Сорбенты для ионной хроматографии

Сорбенты этой группы обладают повышенной скоростью массообмена, что достигается созданием пористой структуры с хорошей проницаемостью при низкой обменной емкости. Как и другие сорбенты, они имеют в качестве основы или силикагель, покрытый полимерным слоем, или полимерную матрицу на основе СТ-ДВБ. Фирмы представляют крайне недостаточную информацию о структурных и других характеристиках этих сорбентов и для этого

варианта хроматографии поставляют только готовые колонки. В табл. III.10 приведены некоторые данные о сорбентах для ионной хроматографии. При их использовании для разделения органических анионов они как сорбенты проявляют преимущественно ситовые свойства.

Таблица III.10. Сорбенты для ионной хроматографии

Сорбент		Основа	Разделяемые ионы	Примечание
Альтекс	1C-1000	АСТ	Анионы	Высокое разрешение
	1C-2500	—	—»—	
	1C-5000	ПСТ	Катионы	
	1C-6000	—	Катионы переходных металлов	
Вескан А	Силикагель, СТ — ДВБ		Неорганические и органические анионы, анионы органических кислот	Высокая эффективность и скорость разделения pH 1—13
	СТ — ДВБ		Специфические анионы	
	В, Н		Органические и неорганические катионы переходных металлов	
Видак	300 1C	Силикагель	Анионы	pH 1—9
	302 1C		—»—	pH 1—7
	400 1C		Катионы	pH 1—9
Супелкосил С 1C (модифицирован аммониевыми группами)		Силикагель	Сточные воды	Низкая емкость сорбента
Хамилтон РРР Х1000 (модифицирован триэтиламмонием)		СТ — ДВБ	Анионы, щелочные и щелочноземельные металлы	$E=0,2$ экв/г
РРРХ2000				
ХИКС-1	Сепарон		Катионы	Слабая стабильность

АСТ — акрилостирол, ПСТ — полистирол

#### 1.4. СПЕЦИАЛЬНЫЕ СОРБЕНТЫ

Сорбенты широкого применения дополняют сорбентами для решения специализированных задач: разделение энантиомеров (хиральные), нуклеотидов, катехоламинов, нуклеозидов, гидрофильных и гидрофобных протеинов, биополимеров, в том числе олигонуклеотидов, вирусов, РНК и других аминокислот; анализ сахаров, определение анионов в воде, полициклических ароматических углеводов (РАН) в питьевой воде, биологически активных экстрактов.

Группу специальных сорбентов представляют нуклеогены на



основе силикагеля нуклеосил:

Нуклеоген	DEAE-600	DEAE 500	$d_p$ -4000
$d_n$ , нм	6	50	400
$d_p$ , мкм	7	10	10

Сорбенты с хиральными фазами для разделения энантиомеров в их рацемических смесях получены на основе силикагеля с привитыми динитробензоилпроизводными фенилглицина и лейцина (электроноакцепторная серия сорбентов) и с привитыми производными нафтилаланина (электронодонорная серия сорбентов). Размер сферических частиц сорбента 5 мкм.

Для анализа смесей лекарственных препаратов в биологических жидкостях без удаления из сыворотки пептидов предложены специальные сорбенты Пинкертона, внешняя поверхность которых гидрофилизована и не удерживает соединений, а внутренние поры (98% поверхности) гидрофобизованы, образуя при этом обращенную фазу (рис. III.4). Основа сорбента — силикагель с частицами сферической формы  $d_p = 5$  мкм,  $S_{уд} = 220$  м<sup>2</sup>/г, начальный  $d_n = 8$  нм, после обработки — 5 нм. Неподвижная фаза — трипептид глицинфенилаланинфенилаланил. Молекулы протеинов слишком велики для проникновения внутрь глобулы, тогда как молекулы лекарственных веществ и их метаболиты имеют меньшие размеры, поэтому проникают внутрь пор и хроматографируются.

Безусловно перспективны биопористые сорбенты, имеющие набор широких и узких пор с достаточно высокой степенью однородности каждого из типов пор.

Следует иметь в виду, что фирмы обычно поставляют готовые колонки и гораздо реже сами сорбенты.

Анализ приведенных в разделе данных по разным типам сорбентов для различных вариантов жидкостной хроматографии показывает, что сорбенты синтезируют в основном по сходным схемам, они чаще имеют в своей основе матрицу силикагеля и несколько реже матрицу полимера и обладают широким разнообразием структурных характеристик. В способах их получения и модификации много общего. В некоторых случаях сходные задачи решаются с использованием разных сорбентов: например, для разделения биополимерных систем используют сорбенты гелевой структуры и  $C_{18}$ ; задачи, решавшиеся ранее только методом

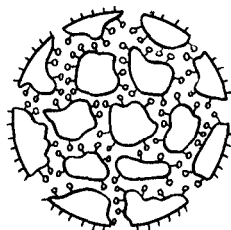


Рис III 4 Бифункциональный сорбент Пинкертона

ионной хроматографии, решают с использованием сорбентов типа  $C_{18}$ .

Важным является вопрос о сроках годности сорбентов для ВЭЖХ. В сорбентах на основе силикагеля в процессе использования происходит медленный гидролиз связей  $—Si—O—Si—$ , в результате чего увеличивается число свободных силанольных групп, что нередко приводит к изменению селективности колонки и изменению характеристик удерживания. В первую очередь это относится к сорбентам типа  $C_2—C_{18}$ . Разработаны специальные реагенты для регенерации сорбентов и колонок. Процедура регенерации обычно достаточно проста. Например, из сорбентов  $C_2—C_{18}$  промывкой метанолом удаляют воду, затем вводят метиленхлорид как среду для проведения реакции и регенерирующий агент. Через устройство для ввода пробы регенерацию осуществляют в течение 15—40 мин в зависимости от природы реагента. Иногда эту операцию повторяют дважды.

При изложении не было необходимости в выделении в отдельную группу сорбентов для обращеннофазной хроматографии. Основа для всех сорбентов одинакова, одинаковы и методы прививки функциональных групп. Использование в сочетании с обращеннофазными сорбентами полярных подвижных фаз вряд ли является достаточным основанием для выделения этих систем в самостоятельный вариант жидкостной хроматографии, называемый обращеннофазным, хотя это и принято в настоящее время.

## Глава 2

### КОЛОНКИ ДЛЯ ВЭЖХ

Успех ВЭЖХ обусловлен не только созданием универсальных и специфических сорбентов для ВЭЖХ, но и созданием специальных колонок, в полной мере учитывающих все особенности реализации процесса хроматографического разделения в ВЭЖХ. Наиболее важно решение двух задач: создание максимального однородного слоя частиц сорбента в цилиндрической трубке и сведение к минимуму мертвых объемов в колонке и соединительных устройствах. В аналитической практике нашли применение в основном колонки двух типов: микроколонки диаметром 0,5—1 мм, длиной 5—10 см и обычные аналитические колонки диаметром 3—5 мм, длиной 5—25 см. Набор последних типов колонок очень разнообразен.

Выбор типа колонок в существенной мере зависит от сложности решаемой задачи разделения. Принято рассматривать разделения с  $\alpha = 1,01—1,03$  как трудные, при которых требуется 50—100 тыс. теоретических тарелок, с  $\alpha = 1,03—1,07$  как средней трудности

(требуется 20—50 тыс. теоретических тарелок) и с  $\alpha = 1,07$  как простые. Сложность заключается не столько в создании колонок, соответствующих трем указанным типам разделений, сколько в разработке аппаратуры, которая бы в полной мере соответствовала этим колонкам. Объем коммуникаций хроматографа (соединительные капилляры, кюветы детектора) и мертвые объемы должны быть в 3—10 раз меньше объема пика неударживаемого соединения.

Наиболее распространенными остаются аналитические колонки с  $d_k = 4,6$  мм. С точки зрения здравого смысла и экономии расхода подвижной фазы целесообразно уменьшить диаметр колонки; при переходе к  $d_k = 2$  мм расход подвижной фазы сокращается в 4 раза. Однако при этом уменьшается в 4 раза и объем колонки, что требует снижения также в 4 раза мертвых объемов в системе, а снижение объема кюветы детектора уменьшением длины оптического пути приводит к соответствующему снижению чувствительности прибора.

## 2.1. КОНСТРУКЦИОННЫЕ ОСОБЕННОСТИ АНАЛИТИЧЕСКИХ КОЛОНОК

Аналитическая колонка представляет собой трубку из нержавеющей стали, заполненную сорбентом и закрытую с обеих сторон фильтрами (фритами) для предотвращения высыпания сорбента. Внутренний диаметр аналитических колонок 2—6 мм. При использовании микроколонок с  $d_k = 0,5$ —2 мм необходимы специальные приборы типа хроматографа «Миллихром». Соединение колонки с детектором и дозатором осуществляется стандартным капилляром минимальной длины с наружным и внутренним диаметром 1,6 и 0,25—0,3 мм соответственно. Уменьшение диаметра капилляра приводит к возрастанию вероятности его закупорки. Используемые фильтры обычно имеют эквивалентный диаметр пор  $d_p \approx 2$  мкм, что не создает значительного сопротивления потоку и надежно защищает сорбент от высыпания. Необходимость перехода от малого диаметра в капилляре к большему в трубке самой колонки, высокий перепад давлений на колонке (особенно в процессе упаковки), а также недопустимость образования мертвых объемов определяют конструкционные особенности колонок. Кроме этих основных требований, необходимо учитывать еще потребительские качества, среди которых одно из важных — обеспечение возможности продления срока службы колонки соединением ее с предколонкой. В последние несколько лет обращают внимание на легкость сборки — разборки колонки и возможность проводить эти операции без специального инструмента за минимальное время. Для получения высокой эффективности колонки очень большое значение имеет качество обработки внутренней поверхности трубки колонки. Цена готовых колонок достаточно высока.

Наиболее распространены колонки, собранные из стандартных

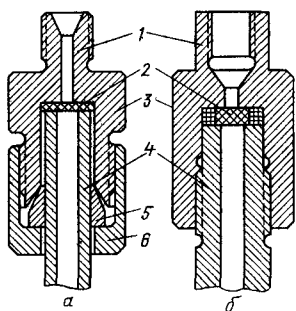


Рис III 5. Конструкция колонок типа «свейджлок» (а) и «хайбар» (б)

1 — концевой штуцер, 2 — фильтр, 3 — уплотняющее кольцо, 4 — трубка колонки, 5 — уплотняющий конус, 6 — гайка

соединений типа «свейджлок» (рис. III.5). В своем классическом виде они не удовлетворяли основному требованию — отсутствию мертвых объемов. После некоторых усовершенствований мертвые объемы устраняются, но остаются недостатки, принципиально присущие данной конструкции: конусное уплотнение после первой затяжки плотно садится на трубку и даже слегка ее сминает, диаметр трубки (обычно тонкостенной) в этом месте уменьшается; при многократном использовании внутренняя поверхность штуцера и наружная поверхность конуса деформируются и для герметичного уплотнения требуется более сильная затяжка; при замене штуцера возможна разгерметизация при неплотном прилегании торца колонки к пористому фильтру и образование мертвого объема.

Общим недостатком многих конструкций является то, что при затяжке концевой гайки должны одновременно с большой точностью соприкоснуться две пары плоскостей: торец колонки — фильтр и уплотнительное кольцо (конус) — штуцер. Это хорошо видно на примере колонки типа «свейджлок» (см. рис. 3.5,а), где эти пары разделены расстоянием в 5—10 мм. В момент затяжки, когда внешняя поверхность конуса прижимается к внутренней поверхности штуцера, торец колонки должен подойти к фильтру. Возможное смещение в соединении конусной пары может привести при повторной затяжке к разгерметизации или образованию мертвых объемов. Поэтому замена отдельных деталей нежелательна. В конструкции типа «хайбар», разработанной фирмой «Мерк» (ФРГ), эти недостатки менее заметны, так как соединяемые пары плоскостей параллельны и практически совпадают. Для сборки — разборки колонок типа «свейджлок» и «хайбар» требуются специальные инструменты. Предколонки, используемые для защиты основной колонки, конструктивно выполнены так же, как сами колонки, но длина их 50—70 мм (меньше невозможно из-за необходимости установки двух концевых штуцеров).

На рис. III.6 представлены конструкции колонок фирмы «Браунли» (США) и «Кнауер» (ФРГ), характерной особенностью

которых является перенос фильтра внутрь колонки. В обеих конструкциях можно отметить наличие фильтра с довольно большим объемом.

На основе колонок конструкции фирмы «Браунли» (см. рис. III.6) были разработаны колонки патронного типа, помещаемые во внешний цилиндр-держатель и собираемые вручную. Конструкция такого типа позволяет присоединить предколонку или стыковать две колонки без промежуточных соединительных капилляров. Колонки конструкции подобного типа выпускают почти все ведущие хроматографические фирмы.

Конструкция колонки «софтсил» фирмы «Scientific Systems» (США) отличается формой уплотняющего элемента (рис. III.7). По сравнению с колонкой тех же размеров типа «свейджлок», патрон этой фирмы существенно дешевле и более прост в обращении. Фирма «Альтекс» (США) также выпускает подобную систему, отличающуюся тем, что в ней присутствует внешний держатель. Аналогичную конструкцию имеют и предколонки, соединяемые с основной колонкой с помощью переходного элемента. Среди преимуществ данной конструкции следует отметить легкость и быстроту сборки — разборки, а также низкую стоимость. Фирма «Альтекс» (США) одной из первых разработала оригинальную патронную систему колонок. Колонка выполнена из пластмассы и заключена в камеру, в которой создается высокое давление, обеспечивающее плотный контакт частиц сорбента со

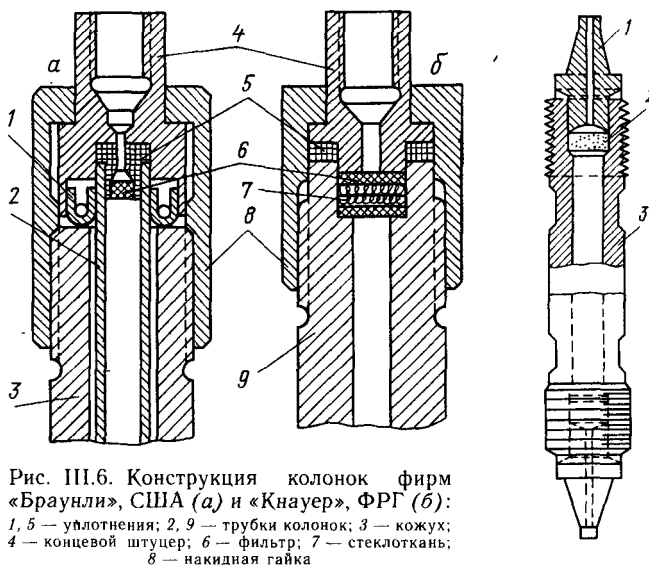


Рис. III.6. Конструкция колонок фирм «Браунли», США (а) и «Кнауер», ФРГ (б):

1, 5 — уплотнения; 2, 9 — трубки колонок; 3 — кожух;  
4 — концевой штуцер; 6 — фильтр; 7 — стеклоткань;  
8 — накидная гайка

Рис. III.7. Конструкция колонки типа «софтсил» фирмы (США):

1 — уплотняющий элемент; 2 — фильтр; 3 — трубка колонки

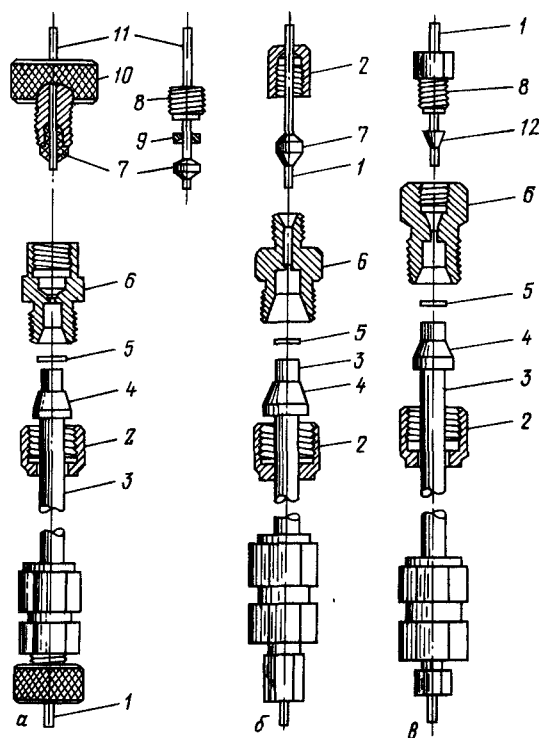


Рис. III 8 Схема колонок, выпускаемых предприятием «ЭЛСИКО» для советских потребителей:

*а* — колонки к хроматографам «Милихром» (ф 1 и 2 мм), *б* — колонки к хроматографам серии «Цвет» (ф 3 и 4 мм), *в* — колонки стандартные аналитические (ф 1, 2, 3 и 4 мм), 1 — капилляр, 2 — гайка, 3 — трубка, 4 — конус, 5 — фрит, 6 — штуцер, 7 — уплотнитель из политетрафторэтилена, 8 — винт, 9 — шайба, 10 — головка, 11 — игла, 12 — ферула

стенкой колонки за счет частичной деформации последней.

Новыми по своей идее являются конструкции колонок фирмы «Ватман» и «Райнин» (США). Основная задача, решаемая этими конструкциями, — продление срока службы колонки за счет компенсации усадки верхнего слоя сорбента. Известно, что после определенного срока эксплуатации сорбент дает усадку и в верхней части колонки образуется пустота — мертвый объем. В колонках фирмы «Ватман» под названием «партисфер» и фирмы «Райнин» под названием «динамикс» фильтр и уплотняющий элемент расположены внутри самой колонки, что позволяет при необходимости устранить мертвый объем, перемещая их до соприкосновения со слоем сорбента. Этим колонкам присущи все достоинства, характерные для колонок патронного типа.

Предприятие «ЭЛСИКО» разработало для советских потребителей свои конструкции колонок для высокоэффективной жидкостной хроматографии (рис. III.8). Колонки представляют собой

трубки из нержавеющей стали с внутренней полированной поверхностью. Внутренний диаметр 1, 2, 3, 4, 8 и 10 мм, толщина стенки 1—2 мм, длина колонок от 40 до 300 мм. Конструкция концевых фитингов стандартизована, обеспечивает минимальный контролируемый метровой объем и присоединение к любому советскому или зарубежному хроматографу.

Колонки диаметром 1—4 мм уплотняются стандартными конусами, надежно обеспечивающими герметичность при давлениях 30—50 МПа.

Принципиальным отличием колонок является фторопластовый уплотнитель, помещенный в кольцевую канавку с зазорами меньше 0,1 мм, что обеспечивает длительную работу колонки без разгерметизации, легкость сборки и многократное перезаполнение ее без смены уплотнителя.

Регулируемое положение наконечника колонки позволяет плотно прижать фрит к торцу трубки с нулевым мертвым объемом.

Специально для хроматографов типа «Милихром» разработаны оригинальные колонки размерами  $2 \times 80$  и  $2 \times 120$  мм, которые имеют следующие преимущества перед серийными колонками: отсутствует пайка, что повышает коррозионную стойкость; полированная трубка со стенками толщиной 1 мм обеспечивает большую механическую прочность и многократное перезаполнение колонки без деформации; фриты легко вынимаются для чистки и замены; оригинальные зажимные устройства для иглы и капилляра надежно обеспечивают герметичность.

Колонки «Милихром» выпускают в двух вариантах: для ручного (Милихром, Милихром-1, Милихром-1А) и для автоматического (автосамплер в Милихром-2 и Милихром-4) ввода пробы.

Для хроматографов серии «ЦВЕТ» выпускают колонки внутренним диаметром 3 и 4 мм с конусными концевыми фитингами, приспособленными для присоединения только к этим приборам.

Фирма «Тессек» (ЧСФР) выпускает колонки CGS, изготовленные из стекла, получаемого по специальной технологии и выдерживающего давление до 7 МПа. Эта фирма производит также колонки из нержавеющей стали.

Определенную роль в конструкции колонки играют фильтры, которые являются не просто пассивным элементом, предохраняющим сорбент от высыпания, но осуществляют также распределение потока и пробы в колонке. Известны несколько конструкций фильтров. Наиболее распространена простейшая конструкция фильтра в виде диска с наружным диаметром, равным наружному диаметру колонки, и толщиной 0,3—1,5 мм. Эквивалентный диаметр пор равен 2—0,5 мкм. Фильтры изготавливают из порошка нержавеющей стали или титана. Такие фильтры чаще всего используют в колонках типа «свейджлок». Другой тип фильтров, отличающийся от первого тем, что он состоит из нескольких слоев тончайшей сетки и фильтрующего элемента, используют в колон-

ках фирмы «Кнауер» и в колонках CGS. Этот фильтр помещен внутрь колонки и поэтому избавлен от недостатка, присущего первому типу — возможности диффузии образца в полости между трубкой колонки и стенкой наконечников.

Дальнейшим развитием конструкции фильтра явился комбинированный фильтр, запрессованный в кольцо из полимерного материала. В этой конструкции полимерное кольцо препятствует растеканию образца и служит в качестве уплотнения, как, например, в конструкции «хайбар». Комбинированные фильтры выпускают также с утолщением в центре. Причем фирма «Альтекс» рекомендует устанавливать выступ в направлении слоя сорбента, а фирма «Ватман», наоборот, выпуклой стороной к входному капилляру, при этом на входном фланце делается специальное углубление. Обе фирмы сообщают об улучшении симметрии пика при использовании фильтров такой конструкции. Фирма «ISCO» (США) применяет на выходе из колонки фильтр конической формы, направленный конусом в сторону детектора и служащий для улучшения симметрии пика. По-видимому комбинированный фильтр имеет преимущество перед простым фильтрующим диском.

При рассмотрении конструктивных особенностей колонок необходимо упомянуть о механической прочности элементов крепления капилляра к колонке. Обычно используют два типа крепления: внешнее и внутреннее (см. рис. III.5). Внешний тип крепления обычно менее прочен. Внутренний тип крепления предпочтителен, кроме того, он компактнее и позволяет соединять элементы системы более короткими капиллярами.

На основе анализа конструктивных особенностей колонок можно отметить, что наиболее широко по-прежнему распространены колонки с  $d_k = 4,0—4,6$  мм. По-видимому, в ближайшее время основное место займут колонки меньшего диаметра (2—3 мм) как более экономичные. Колонки имеют длину от 30 до 250 мм, что позволяет решать задачи разной трудности и оптимизировать время анализа. Все фирмы выпускают предколонки, повышающие срок службы основной колонки.

Имеются колонки с возможностью компенсации проседания сорбента, что должно значительно увеличить срок службы колонок, а также колонки, выполненные из инертных материалов (стекло, тефлон), что позволит расширить области применения ВЭЖХ.

## 2.2. ЗАПОЛНЕНИЕ КОЛОНОК

Приготовление высокоэффективных колонок для ВЭЖХ является одной из наиболее трудновоспроизводимых процедур, обычно требующих гораздо больших усилий, чем простое повторение литературных прописей. Помимо общих причин неудач, возникающих при попытках воспроизвести любую методику заполнения колонок, имеются две специфические причины: описа-



ние методик дается очень кратко, часто без упоминания важнейших деталей, причем не только в фирменных материалах, но и в научных статьях; не существует общепринятой теории процесса.

Общий принцип заполнения колонок для ВЭЖХ выглядит просто: необходимо создать суспензию подходящего сорбента и ввести ее в металлическую трубку-колонку с фильтром (фритой) на конце. Все определяется комплексом деталей образования суспензий и особенностей ввода этой суспензии. Прежде всего, для того чтобы избежать разделения частиц сорбента по размерам в процессе упаковки, подбирают смесь нескольких жидкостей с плотностью, близкой к плотности силикагеля. Частицы сорбента в такой жидкости долгое время не оседают. Метод получил название «сбалансированной плотности».

В более распространенном вязкостном методе для получения стабильной суспензии используют жидкости или смеси с  $\eta = 2,5—5$  сП. В качестве вязких компонентов применяют циклогексанол (5 сП), этиленгликоль (20 сП), глицерин и др. Вместе с тем для заполнения колонок используют такие маловязкие жидкости, как ацетон, метанол, этанол, диоксан, тетрахлорметан, воду и др. При изучении влияния концентрации суспензии на качество упаковки установлено небольшое монотонное снижение эффективности при повышении концентрации от 2 до 25%. В большинстве работ применяют суспензии концентрации 5—10%. В некоторых работах предпочтение отдают разбавленным суспензиям с расчетом на то, что разбавленная суспензия должна давать более плотную и стабильную упаковку, потому что каждая частица сорбента может упаковываться почти независимо и имеет больше шансов «устроиться поплотнее» прежде, чем будет «погребена» под другими, падающими на нее частицами.

Основные требования, предъявляемые к суспензионной среде: агрегативная устойчивость, хорошее смачивание частиц сорбента, отсутствие агломерации. Все полярные жидкости (ацетон, метанол, вода) хорошо смачивают силикагель любой влажности.

Для привитых сорбентов выбор суспензионной жидкости сложнее. Даже наиболее простой и хорошо изученный силикагель с привитым октадецилсиланом, поверхность которого считается гидрофобной и должна хорошо смачиваться неполярными жидкостями, ведет себя нередко непредсказуемо. Сорбент С-8, для которого подобрана хорошо смачивающая жидкость, ведет себя аномально при самой упаковке. Обычно после заполнения слой сорбента в колонке настолько плотный, что открытую колонку можно как угодно переворачивать и держать в таком положении. Сорбент С-8, хотя и заполнял колонку достаточно плотно (судя по давлению и скорости), частично, а иногда и полностью вытекал из перевернутой колонки. Иногда и в вертикальном поло-

жении колонки при открытом конце упакованный слой выходит из колонки после снятия давления.

Все эти явления принято объяснять тем, что при упаковке возникает большой электрокинетический потенциал, а поскольку привитые сорбенты являются изоляторами, то на их поверхности возникает избыточный заряд, «расталкивающий» частицы. Для снятия заряда рекомендуется добавлять в суспензию немного электролита, например ацетата натрия. В поисках наилучших условий испробованы многокомпонентные смеси с добавкой поверхностно-активных органических кислот и др. В целом подбор суспензионной жидкости и условий заполнения для привитых сорбентов пока еще проводится эмпирически. Неоднократно предпринимались попытки проанализировать опубликованные данные и выявить общие закономерности процесса упаковки, но обычно все сводилось к изложению основных фактов и некоторых частных закономерностей.

Одним из основных факторов, определяющих качество упаковки, является гидродинамический режим — давление и скорость течения суспензии. В высококачественных колонках ( $H=2-3 d_p$ ) давление варьируется от 150 до 180 МПа. Роль давления и его влияние на процесс упаковки могут быть выяснены только в сравнительных опытах, где прочие факторы постоянны. Наиболее часто колонки заполняют методом «удара» при постоянном давлении. Упаковка с начала и до конца идет при установленном давлении. В других случаях колонки заполняли при постоянном расходе элюента, а давление росло от 0 до указанного в конце упаковки. Затем при максимальном давлении через колонку в течение 10—15 мин пропускали чистую жидкость. Заполнение колонки сорбентом занимало от 1 мин до 5—6 мин. Можно считать, что эффективность колонки с ростом давления проходит через максимум, а затем существенно снижается. Одновременно по мере роста давления упаковки уменьшается проницаемость колонок. Причем рост сопротивления не связан с разрушением частиц силикагеля.

Замечено, что чем меньше давление, тем более проницаемы колонки и тем быстрее они «садились» и теряли исходную эффективность. Можно считать установленным, что повышать давление можно только до определенного предела, после которого не только возрастает сопротивление, но и заметно падает эффективность. В некоторых работах рекомендуется после окончания заполнения колонки при 50—70 МПа для «консолидации» уже упакованного слоя провести серию резких гидравлических ударов при максимально доступном давлении. Для колонок длиной 100—250 мм и диаметром 3—5 мм оптимальное давление равно 20—50 МПа независимо от того, резко или постепенно приложено давление. Однако нередко максимальной эффективности достигают в тех случаях, когда упаковку проводят при постоянном давлении

20 МПа до заполнения колонки сорбентом, а затем медленно, ступенчато поднимают давление до 400 МПа.

Пожалуй, единственная рекомендация, в которой все авторы единодушны, — это необходимость тщательного удаления перед упаковкой мелких, пылевидных частиц сорбента. Исследование искусственных смесей сорбентов с известным распределением частиц по размеру показало, что частицы диаметром в 6—7 раз меньше среднего резко ухудшают качество колонки, даже если их очень мало. Поэтому почти во всех случаях на предварительной стадии используют седиментацию для осаждения мелких частиц.

Для заполнения колонок используют установки, изображенные на рис. III.9. В одной — резервуар для суспензии образован длинной узкой трубкой ( $d=6-15$  мм,  $l=20-100$  см,  $V=10-200$  см<sup>3</sup>). В другой — резервуаром является специальный сосуд высокого давления, у которого диаметр примерно равен высоте,  $V=10-50$  см<sup>3</sup>. Содержимое перемешивается магнитной мешалкой, так как даже для сбалансированной суспензии вероятность расслаивания велика при малой высоте. В установке с мешалкой колонка присоединяется непосредственно к верхней части резервуара и заполнение производится снизу вверх. Результаты попыток одновременной установки на резервуаре нескольких колонок оказались маловоспроизводимыми, так как размер и форма присоединяемых деталей оказывали значительное влияние на качество упаковки.

В некоторых работах резервуар соединяют с колонкой при помощи капилляра ( $d=1-1,5$  мм), как показано на рис. III.9,а. Предполагается, что в капилляре происходит дополнительное перемешивание, предотвращающее сегрегацию. Такой капилляр позволяет создать «комбинированный» прибор: в резервуаре течение сверху вниз, в колонке — снизу вверх. Заполнение снизу вверх дает стабильно более эффективные и воспроизводимые колонки при вводе пробы краном, хотя при вводе пробы шприцем все методы упаковки оказываются одинаковыми.

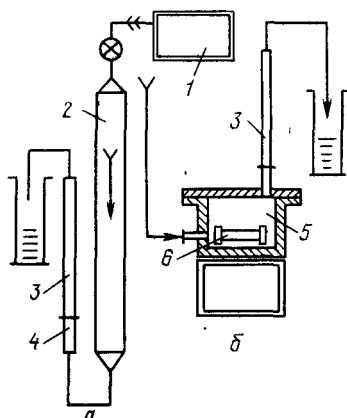


Рис. III.9. Схемы установок для упаковки колонок:

1 — насос высокого давления, 2, 5 — резервуары для суспензии, 3 — колонка, 4 — переходник, 6 — магнитная мешалка

В последние годы применяют модификацию, сочетающую преимущества обоих вариантов: вначале до полного заполнения колонки заполняют снизу вверх, а затем колонку переворачивают и заканчивают заполнение сверху вниз.

Большое значение имеет конструкция присоединения колонки к резервуару с суспензией. Во многих работах используют резервуар с плавным переходом от большого диаметра к меньшему. Такая конструкция не позволяет использовать один и тот же резервуар для колонок разных типов и разного диаметра. Иногда применяют переходные форколонки между резервуаром и колонкой, что позволяет использовать один резервуар для нескольких разных колонок. Жидкость из колонки вытекает в открытый сосуд, поэтому при заполнении колонки с помощью насоса постоянного расхода суспензии давление в колонке возрастает от 0 до максимума линейно по мере упаковки ее сорбентом. При постоянном давлении расход суспензии по мере заполнения колонки многократно снижается.

Найдено, что само по себе давление при постоянном расходе суспензии мало влияет на эффективность. Лучшие результаты получаются, если давление и расход суспензии по всей длине колонки изменяются как можно меньше. В новом типе установки для заполнения колонок на выходе из колонки присоединена упакованная таким же мелким сорбентом более длинная колонка, что создает сопротивление намного больше, чем сопротивление заполняемой колонки. Вследствие этого в процессе упаковки скорость потока и давление в колонке меняются мало.

Большинство производителей колонок пользуются очень сходной аппаратурой для заполнения колонок. Но зачастую даже при чисто внешнем сходстве методов заполнения производители пользуются большим разнообразием приемов. В последнее время потребители ВЭЖХ на 90% используют готовые колонки, в подавляющем большинстве случаев обеспечивающие воспроизводимые результаты анализа.

### 2.3. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА КОЛОНОК ДЛЯ ВЭЖХ

Основными параметрами, которыми фирмы-изготовители и потребители характеризуют качество колонок, являются эффективность  $N$  и коэффициент асимметрии  $A_s$ . Коэффициент асимметрии определяется как 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». 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 их числе неравномерное

распределение пробы по сечению колонки, наличие мертвых объемов, плохое качество обработки стенки колонки и др.

Наиболее удобно сравнивать качество упаковки колонок, используя значение  $h$ , равное высоте, эквивалентной теоретической тарелке  $H$ , отнесенной к среднему диаметру частиц  $d_p$ . Вполне удовлетворительным принято считать колонки со значением  $H$ , равным 3—3,5  $d_p$ . Очень хорошими считаются колонки с  $H$ , равным 2  $d_p$ .

Большинство изготовителей используют сорбенты с частицами  $d_p=3, 5$  и 10 мкм. Размер частиц 5 мкм — наиболее распространенный и при длине 150 мм можно получать колонки с  $N=10\,000$  т. т., на которых по сравнению с колонками длиной 250 мм уменьшается продолжительность анализа на 40%. При использовании частиц с  $d_p=3$  мкм можно уменьшить длину колонки до 50—100 мм, сократить продолжительность анализа, однако при этом резко возрастает перепад давления. Сорбенты с частицами  $d_p=10$  мкм используют для достаточно простых задач, когда необходимо применять вязкие подвижные фазы, либо для очень сложных разделений, когда необходимо обеспечить общую эффективность более 50 000 т. т.

Для оценки эффективности часто используют приведенное число теоретических тарелок, которое получается отношением числа реально полученных теоретических тарелок на колонке данной длины к условной колонке длиной 1 м. При этом получают значения до 50—100 тыс. теоретических тарелок на 1 м. Если сравнить это с соответствующими значениями, достигаемыми в газовой хроматографии — 2 тыс. теоретических тарелок на 1 м для насадочных и 3—4 тыс. теоретических тарелок на 1 м для капиллярных колонок, то представляется, что в жидкостной хроматографии достижимы более высокие эффективности. Однако реально в газовой хроматографии можно иметь колонку имеющую суммарно 1 млн теоретических тарелок, тогда как в жидкостной это пока недостижимо.

На основании опубликованных данных по эффективности рассчитаны значения  $h$  и  $h_{\text{мин}}$  для сорбентов с различными  $d_p$ . Разброс значений  $h$  составляет  $\pm 25\%$ :

$d_p$ , мкм	3	5	10
$H_z$	3,3	3,3	3,2
$H_{z \text{ мин}}$	2,7	2,0	2,0

Для оценки эффективности колонки по  $h$  требуется знание достаточно точного значения  $d_p$ . Поскольку всегда существует разброс частиц по размерам, то определяют средний размер зерна сорбента. Использование достаточно точно экспериментально найденного значения  $N$  и, как правило, завышенного значения  $d_p$  приводит к искажению  $h$ . Необходимо использовать и другие параметры, которые можно определить достаточно надежно, на-

пример такие, как проницаемость колонки. 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.

Для ускоренной оценки стабильности колонки рассмотрим основные параметры, влияющие на процесс разделения. Известно, что зависимость  $N$  от линейной скорости элюента хорошо описывается известным уравнением Ван-Деемтера. Первый член этого уравнения  $Ad_p$  отражает вклад гидродинамических факторов. Чем более однородны частицы сорбента по форме и размерам и чем более равномерно они упакованы, тем меньше  $A$ . Если еще недавно принимали  $A=3$ , в настоящее время достижимо  $A=1$ . Поскольку методика заполнения колонок за последнее время существенно не изменилась, то решающим фактором в получении высокоэффективных колонок является качество сорбента.

Очень важным 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  $S_{уд}=200\text{—}600\text{ м}^2/\text{г}$ , объем пор составляет 0,2—1,0 мл на 1 мл упакованного слоя. Объем элюента между частицами (внешняя пористость)  $\approx 0,4$  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 10 000—40 000 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 элюентом 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  $C=0,03\text{—}0,07$ .

Для полной характеристики качества колонок необходимо определить  $N$  в широком диапазоне скоростей элюента, построить

достоверную кривую зависимости  $H$  от  $\bar{u}$  и рассчитать коэффициенты  $A$  и  $C$ .

Эффективность колонки определяется отношением времени удерживания известным уравнением (1.62). В том случае, когда  $A_s \leq (1,2-1,3)$ , можно пользоваться другой формулой:

$$N = \frac{41,7 (t_R b_{0,1})}{(a_2/a_1) + 1,25} \quad (\text{III.1})$$

где  $b_{0,1}$  — ширина пика на высоте 10% от его основания;  $a_1, a_2$  — отрезки, характеризующие симметрию пика.

Полученные значения  $N$  обычно являются завышенными по сравнению с рассчитанными по приведенному уравнению, поэтому многие исследователи традиционно пользуются графическим методом, позволяющим оценить качество упаковки более достоверно.

При стандартизации условий тестирования колонок необходимо в первую очередь выявить кинетику процесса, а не термодинамику, при этом вещества для тестирования должны обладать идеальными термодинамическими характеристиками, давая хорошо сформированные симметричные пики. Задача тестирования — выявить оптимальные значения параметров самой колонки. С этой целью: тест-проба должна содержать вещества, обеспечивающие наименьшее значение  $H_{\min}$ ; тестирование нужно вести при нескольких скоростях элюента для нахождения  $H_{\min}$  по каждому веществу; необходимо оценивать проницаемость колонок, чтобы сравнивать колонки, заполненные разными сорбентами.

Важным фактором колонок для ВЭЖХ является экстраколонное расширение пика (ЭКР). От значения ЭКР зависит как разрешающая способность колонки, так и правильность оценки  $N$ . Большое значение имеет ЭКР при изучении причин, вызывающих размывание хроматографической зоны, а также при оптимизации системы. Очевидно, что от соотношения дисперсии собственно в колонке в мертвых объемах будет зависеть, насколько полученное значение  $N$  приближается к истинному. Когда ставится задача уменьшения диаметра или длины колонки, повышения  $N$  и перехода к сорбентам с меньшим диаметром зерна, одним из критериев соответствия для решаемой задачи выбранной колонки и применяемой аппаратуры служит ЭКР. ЭКР можно снизить, уменьшая длину соединительных капилляров, объем кюветы, постоянную времени электронной схемы детектора.

В табл. III.11 приведены расчетные значения  $\sigma_k^2$  и допустимые значения  $\sigma_{\text{ЭКР}}^2$  для некоторых основных типоразмеров колонок. Для расчета  $N$  размер частиц взят равным 5 мкм, а качество упаковки выражено через приведенную эффективность  $h=3$ . Обычно с увеличением расхода элюента возрастает  $\sigma_{\text{ЭКР}}^2$ .

Один из методов определения ЭКР заключается в том, что из системы удаляют колонку, а выход инжектора присоединен, исключая мертвые объемы, к детектору. Точность определения ЭКР

Таблица III.11 Значения  $\sigma_k^2$  для колонок разных размеров при различных  $k^1$

Параметры колонки	$\sigma_k^2$ (мкл <sup>2</sup> ) при $k^1$			$\sigma_{ЭКР}^2$ (мкл <sup>2</sup> ) при $k^1$		
	0	1	5	0	1	5
250·4,6 мм, $N=16\ 000$ т т, $V_0=$ =3100 мкл	580	2330	20 966	58	230	2100
150·3 мм, $N=10\ 000$ т т, $V_0=$ =800 мкл	64	256	2304	6,4	26	230

этим методом 2—5%. В других методах колонку заменяют последовательно на ряд капилляров различной длины.

Важным фактором оценки колонки является проницаемость. Для определения сопротивления колонки находят с помощью экспериментальных данных  $\Phi$  по формуле:

$$\Phi = \Delta P d_p^2 / L u \eta.$$

Изменение  $\Phi$  в пределах 0,35—0,49 приводит к изменению сопротивления в 5 раз.

Изучение влияния фракционного состава сорбента на  $\Phi$  при одинаковом  $d_p$  показало, что даже небольшие добавки мелких частиц резко увеличивают сопротивление. Для фракций широкого состава расчет вообще теряет смысл. Для сферических частиц рекомендуется ориентироваться на минимальное значение  $\Phi$ , равное 6,5.

Для потребителей наиболее очевидными характеристиками приобретаемой илиготавливаемой хроматографической колонки являются значения условной эффективности на 1 м длины колонки 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 меньше, чем в случае частиц сферической формы. Это объясняется тем, что частицы нерегулярной формы могут быть упакованы более плотно, чем сферические. При этом при прочих равных условиях колонки, заполненные сферическими частицами, имеют лучшую проницаемость.



## ПРИБОРЫ ДЛЯ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Наиболее существенным в развитии хроматографического приборостроения за последние 10 лет является стремительное расширение разработок и выпуска жидкостных хроматографов (ЖХ) при дальнейшем их совершенствовании и устойчивом увеличении выпуска. Более 125 фирм во всем мире серийно производят жидкостные хроматографы. 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 и для охраны окружающей среды. Более 800 фармацевтических фирм вынуждены применять ЖХ, чтобы доказать нетоксичность своей продукции. Растет применение ЖХ в судебной медицине и для диагностики различных болезней человека и животных [2, 5, 20, 72].

Характеристики процессов в ЖХ практически идентичны характеристикам процессов ГХ. Отличие состоит в применении в качестве подвижных фаз (ПФ) различных жидких растворителей и их смесей. В связи с высокой плотностью ПФ и соответственно большими сопротивлениями колонок в ЖХ, хроматографические приборы для ГХ и ЖХ сильно различаются по аппаратурному оформлению.

### 3.1. НАСОСЫ

Для создания потока чистого растворителя или смеси растворителей (элюента) используют насосы, входящие в гидравлическую схему хроматографа.

Структурная схема современного микропроцессорного ЖХ приведена на рис. III.10 (пунктирной линией показаны потоки элюента, сплошной — электрические соединения). Гидравлическая схема любого ЖХ в простейшем случае состоит из насоса, колонки и детектора. 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. Для уменьшения уровня флуктуационных шумов детекторов насосные системы должны обеспечивать стабильный и без пульсаций расход, 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 ПФ во время анализа, и градиентный, в котором состав ПФ (элюента) меняется во время анализа по заданной программе.

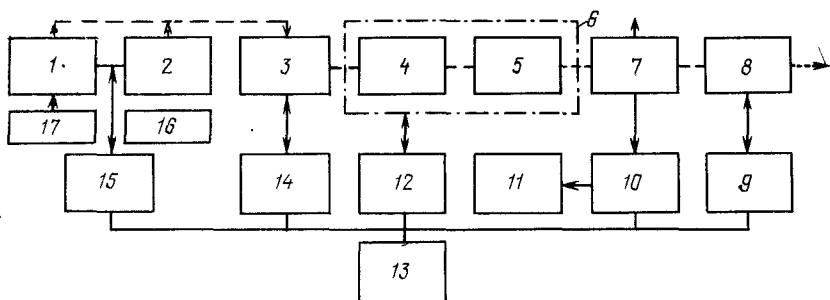


Рис. III 10. Схема высокоэффективного жидкостного хроматографа:

1, 2 — насосы, 3 — дозатор, 4 — предколонка, 5 — колонка, 6 — термостат колонки, 7 — детектор, 8 — коллектор фракций, 9 — блок управления коллектором, 10 — интегратор, 11 — регистратор, 12 — блок регулирования температуры, 13 — микропроцессор, 14 — блок автоматизации ввода пробы, 15 — блок управления градиентного элюирования, 16, 17 — резервуары с растворителем. Сплошная линия — электрический кабель, пунктирная — поток растворителя

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 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 менее 3 мкм и колонок длиной более 200 мм может потребоваться создание более высоких давлений, например 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.

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 специального 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 корпуса насоса является титан и его сплавы с палладием или цирконием (например, марки 4200). Допускается использование аустенитной нержавеющей стали или стали марки (12X18H-10T, ГОСТ 5692—72).

Для плунжеров и шариковых клапанов наилучшими материалами являются лейкосапфир и рубин. Сальники обычно изготавливаются из фторопласта или полиамида, причем последний предпочтительнее. Детали насосной системы, контактирующие с элюентом, должны соединяться переходниками из тех же материалов, из которых изготовлен насос. Применение сварки и пайки не допускается. В связи с непрерывной работой в тяжелых условиях некоторые детали насоса быстро изнашиваются, корродируют, 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. На рис. III.11 представлена схема насоса, в котором элюент из резервуара 5 через трехходовые краны 4 и 8 предварительно заполняет длинную спиральную трубку 7 из нержавеющей

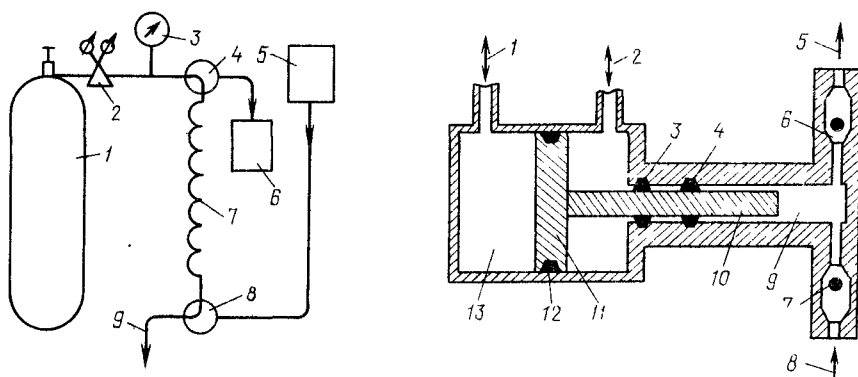


Рис III.11. Газовый насос для жидкостного хроматографа

1 — баллон с газом, 2 — редуктор, 3 — манометр, 4, 8 — трехходовые краны, 5 — резервуар с растворителем, 6 — дренаж, 7 — спираль, 9 — подача элюента в колонку

Рис III.12 Пневмогидравлический насос

1, 2 — вход и выход сжатого газа при работе и заполнении насоса, 3, 4, 12 — кольцевые уплотнения, 5 — выход элюента, 6 — клапан нагнетания, 7 — клапан всасывания, 8 — вход элюента из резервуара, 9 — гидравлическая камера насоса, 10 — плунжер, 11 — поршень, 13 — пневматическая камера

шей стали вместимостью около  $500 \text{ см}^3$ . После заполнения трубку подключают к баллону 1 с газом; с помощью редуктора 2 и образцового манометра 3 устанавливают требуемое давление на входе в колонку 9. Диффузия газа на заднем фронте элюента незначительна в трубке небольшого диаметра. Насосы 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 перезаряжаются достаточно легко. Недостатками являются замены растворителей, связанная с промывкой коммуникаций.

Схема пневмогидравлического насоса приведена на рис. III.12. Давление жидкости, создаваемое плунжером 10, пропорционально давлению газа на поршень 11 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  $60 \text{ см}^3$  ( $60 \text{ см}^3$  для хроматографа «Цвет-304»). Регулировка потока достаточно проста. Поток можно мгновенно остановить. При повторном пуске давление быстро восстанавливается.

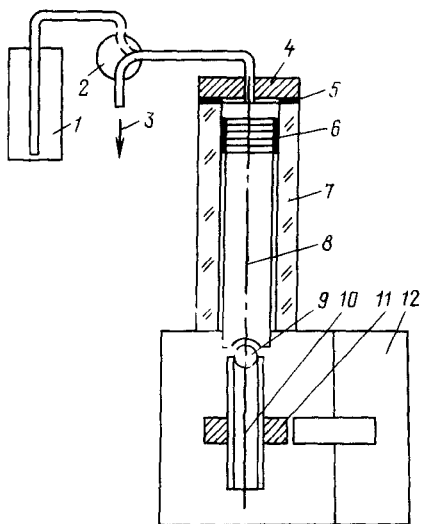


Рис III 13 Шприцевой насос хроматографа «Милихром»

1 — емкость с элюентом, 2 — трехходовой кран 3 — поток элюента, 4 — крышка насоса 5 — прокладка, 6 — поршень 7 — стеклянная калиброванная трубка 8 — шток, 9 — шарик 10—11 — червячная передача 12 — двигатель

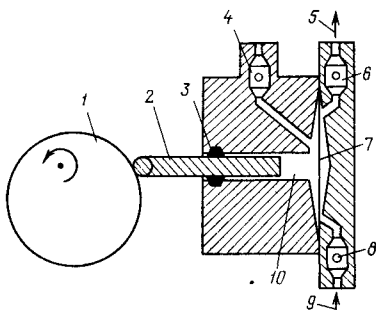
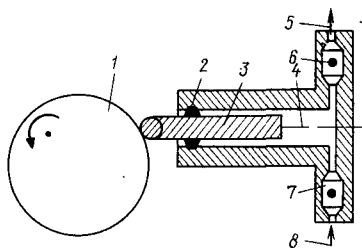


Рис. III.14. Одноплунжерный возвратно-поступательный насос:

1 — эксцентрик; 2 — сальник; 3 — плунжер; 4 — камера с элюентом; 5, 8 — поток элюента; 6 — клапан нагнетания; 7 — клапан всасывания

Рис. III.15. Диафрагменный одноплунжерный насос:

1 — эксцентрик; 2 — плунжер; 3 — кольцевое уплотнение; 4 — обратный клапан; 5, 9 — поток элюента; 6, 8 — шариковые клапаны; 7 — диафрагма; 10 — промежуточная камера

К насосам постоянного расхода относят шприцевые, поршневые и мембранные насосы.

Шприцевой насос, представленный на рис. III.13, применяют в хроматографе «Милихром». С помощью червячной передачи 10—11 от шагового двигателя 12 шток 8 с поршнем 6 движется в калиброванной стеклянной трубке 7, сжимая элюент и пропуская его через трехходовой кран 2 в колонку. При заполнении шприца кран 2 поворачивают в положение, показанное на рисунке пунктиром, а чистый элюент из емкости 1 засасывается в шприц при обратном ходе штока 8, при этом вращение шагового двигателя меняется на противоположное. Полный объем шприца около  $2,5 \text{ см}^3$ , максимальное давление не более 5 МПа, точность подачи элюента около 1%. Насос применяют для обеспечения работы колонок внутренним диаметром 2 мм и длиной 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.

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.

Схема насоса возвратно-поступательного типа с одним плунжером приведена на рис. III.14. Принцип действия насоса основан на вытеснении определенного объема жидкости из камеры 4 с помощью плунжера 3. Плунжер приводится в действие с помощью эксцентрика 1, подсоединенного к двигателю насоса. Насос на входе 8 и выходе 5 имеет обратные шариковые клапаны 6 и 7. Шарiki 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.

Одной из модификаций одноплунжерного насоса является диафрагменный насос, схема которого представлена на рис. III.15. Давление, создаваемое плунжером 2 в промежуточной камере 10 насоса, заполненной инертной малолетучей жидкостью, передается на диафрагму 7, которая вытесняет растворитель через обратный клапан. При обратном ходе плунжера растворитель засасывается в насос через входной клапан 8. Преимуществом мембранного насоса является отсутствие контакта элюента с движущимся плунжером, меньшее загрязнение плунжера и камеры и, соответственно, большая надежность и долговечность работы насоса. 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, состоящую из насоса, демпфера, аварийного клапана максимального давления, измерителя давления, резервуаров с растворителями и фильтров, обычно называют насосной системой или 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 за 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  $180^\circ$  и трехплунжерные насосы со сдвигом на  $120^\circ$ .

На рис. III.16 представлена схема двухплунжерного насоса, управляемого одним двигателем 2. Забор и нагнетание жидкости плунжерами 1 и 3 сдвинуты по фазе и синхронизированы. Пунк-

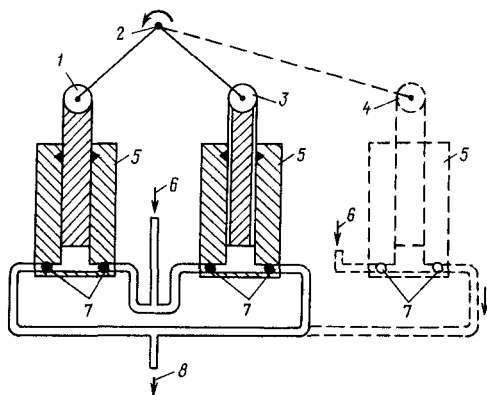


Рис. III.16. Двухплунжерный насос возвратно-поступательного типа:

1, 3 — плунжеры, 2 — привод двигателя, 4 — дополнительный плунжер, 5 — камера насоса, 6, 8 — поток элюента, 7 — шариковые клапаны

тиром показана возможность подключения к системе третьей камеры.

В нашей стране разработана и запатентована за рубежом серия двухплунжерных насосов (насосы Б. И. Баглая), в которых постепенное вытеснение жидкости из одной камеры сопровождается пропорциональным заполнением другой. Конструкция такого насоса предусматривает согласованное движение двух камер, изготовленных в одном корпусе, и одного из плунжеров, причем другой плунжер жестко закреплен. Система обеспечивает достаточно высокую стабильность расхода потока и возможность коррекции на сжимаемость элюента. Необходимость применения демфирующих устройств для двух- и трехплунжерных насосов отпадает. Конструкции насосов возвратно-поступательных типов просты, обычно обеспечен 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, причем в одних случаях полярность элюента увеличивается (адсорбционная ЖХ), а в других уменьшается (обращенно-фазовая ЖХ).

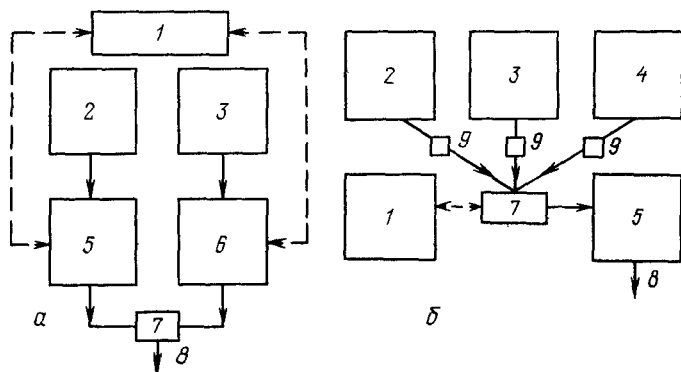


Рис. III.17. Структурные схемы систем градиентного элюирования с одним насосом (а) и с двумя насосами (б):

1 — микропроцессор, 2—4 — емкости с растворителем, 5, 6 — насосы, 7 — камера смешения, 8 — поток элюента, 9 — электромагнитные клапаны. Сплошная линия — элюент, пунктирная — электрический кабель

Используют две различные системы создания градиента: смешение при высоком давлении и смешение при низком давлении. Блок-схемы систем представлены на рис. III.17. Для смешения при высоком давлении (рис. III.17,а) характерно применение отдельных насосов 5 и 6 для каждого типа растворителя 2 и 3 и их смешения в камере 7 на выходе насосов. Смесительная камера должна обеспечивать полное перемешивание растворителей. Насосы управляются по определенной программе, заложенной в устройство программирования или микропроцессор 1.

На рис. III.17,б приведена блок-схема смешения при низком давлении. Растворители из резервуаров 2—4 засасываются насосом 5 через регулируемые электромагнитные клапаны 9 в смесительную камеру 7, из которой смесь растворителей поступает в дозатор и колонку жидкостного хроматографа. Работу клапанов обычно контролируют микропроцессором 1.

Преимуществом последней системы является применение только одного насоса, что снижает стоимость градиентного элюирования и дает возможность смешения нескольких растворителей без значительного удорожания и усложнения всей системы.

### 3.2. МЕТОДЫ ИЗМЕРЕНИЯ РАСХОДА ЭЛЮЕНТА

Наиболее простым и точным методом определения расхода элюента является весовой метод, при применении которого элюент собирают в закрытом сосуде в течение определенного времени и взвешивают. Для осуществления этого метода требуется много времени, особенно при расходах менее  $0,1 \text{ см}^3/\text{мин}$ , он не дает представления о быстрых изменениях и пульсациях потока, так



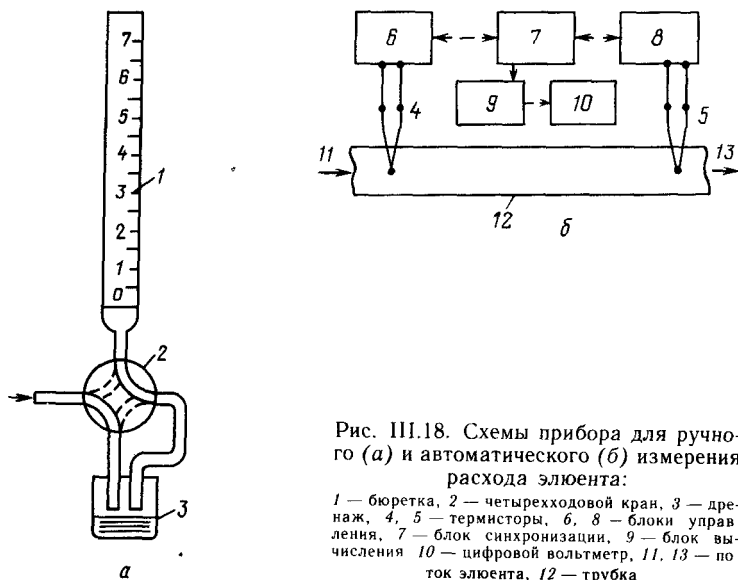


Рис. III.18. Схемы прибора для ручного (а) и автоматического (б) измерения расхода элюента:

1 — бюретка, 2 — четырехходовой кран, 3 — дренаж, 4, 5 — термисторы, 6, 8 — блоки управления, 7 — блок синхронизации, 9 — блок вычисления, 10 — цифровой вольтметр, 11, 13 — поток элюента, 12 — трубка

как результаты измерения усредняются за достаточно большое время. При использовании объемного метода измеряют объем элюента с помощью калиброванного сосуда или бюретки за определенное время. На рис. III.18,а приведено устройство для объемного измерения расхода элюента с помощью калиброванной бюретки 1. Устройство по принципу работы аналогично пенному измерителю расхода в газовой хроматографии. Погрешность определения расхода около  $\pm 1\%$ .

Одним из перспективных методов цифрового измерения расхода элюентов является метод тепловой метки. Блок-схема прибора представлена на рис. III.18,б. Тепловая метка с помощью термистора 4 и блока управления 6 с определенной частотой вводится в поток элюента 11, 13, протекающего через трубку датчика расхода 12. Другой термистор 5 регистрирует максимум пика тепловой метки и передает сигнал на блок управления 8.

Блок синхронизации 7 согласовывает времена выдачи и приема тепловой метки и проводит преобразование сигнала. Блок вычисления 9 проводит определение расхода по данным блока 7 и выдачу сигналов на цифровой вольтметр 10 или (и) регистратор. Погрешность метода меньше 1%, что вполне приемлемо для большинства анализов в жидкостной хроматографии.

### 3.3. СИСТЕМЫ ВВОДА ПРОБЫ

Системы для ввода пробы для ЖХ можно разделить на ручные и автоматические. Среди ручных 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 соответствует 10--100 мкл. Такой метод ввода пробы обеспечивает хорошую воспроизводимость анализа и недорог. Конструкции некоторых кранов позволяют работать с переменными объемами вводимых проб без замены петли. Это бесспорное удобство, однако наличие «мертвого объема» не всегда обеспечивает надежные результаты анализа.

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, причем могут быть использованы как основной, так и дополнительный насос, например в препаративной жидкостной хроматографии.

В современной жидкостной хроматографии практически все автоматизированные системы ввода пробы управляются микропроцессорной техникой. В хроматографе «Милихром-5» («Фосфат»), например, имеются дозаторы двух типов. В ручном дозаторе во вращающемся роторе просверлены каналы объемом 1, 3 и 6 мкл, которые могут быть заполнены пробой с помощью шприца и вручную подключены к потоку элюента путем поворота крана в нужное положение. Автоматическое дозирование осуществляется путем остановки потока ПФ, поднятия герметизированной на входе в колонку дозирующей иглы, забора с помощью шприцевого насоса необходимой пробы объемом от 1 до 100 мкл и вводом ее в колонку после герметизации и при обратном ходе поршня насоса. При этом обычно вся проба размещается в дозирующей игле и «запирается» с обеих сторон «пробками» используемого элюента объемом 1--10 мкл. Все перечисленные операции, а также забор пробы из любой ампулы и создание восьмиступенчатого градиента ПФ дозатор выполняет автоматически по командам от микропроцессорного блока.

### 3.4. БЛОКИ КОНТРОЛЯ ТЕМПЕРАТУРЫ

Большинство разделений в ВЭЖХ осуществляются при температуре окружающей среды. Использование повышенных температур в изотермическом режиме анализа изменяет селективность разделения, способствует снижению вязкости растворителя, позволяет увеличить эффективность колонки. Для реализации режима контроля температуры возможно несколько подходов: тер-

мостатирование с циркуляцией и без циркуляции воздуха; жидкостное термостатирование колонки с циркуляцией теплоносителя от термостатируемого источника; пассивное термостатирование металлического блока или специального термостата, в котором расположены хроматографические колонки, непосредственный нагрев элюента. В современных ЖХ температурный контроль полностью автоматизирован и осуществляется с помощью микропроцессора. Обычный диапазон температур в ЖХ составляет от 35 до 99 °С.

### 3.5. ДЕТЕКТОРЫ

В ходе развития ЖХ было испытано более 20 типов детекторов для ЖХ. Основную массу предложенных детекторов можно разделить на оптические, электрические, электрохимические и детекторы для измерения радиоактивных веществ [4, 20, 62, 67—71]. 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 — регистрации различных физико-химических явлений в одной ячейке детектора. К первой группе детекторов можно отнести электрохимические детекторы (ЭХД) с двумя рабочими электродами, один из которых окислительный, а другой восстановительный. Типичными представителями второй группы являются кварцевый 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, более 50 фирм — спектрофотометрические с переменной длиной волны, более 40 фирм — флуориметрические детекторы, более 30 фирм — рефрактометрические, более 15 фирм — электрохимические.

Большинство фирм, выпускающих жидкостные хроматографы, включают в состав поставляемых приборов не более 3—4 детекторов. Остальные имеющиеся в распоряжении фирмы детекторы могут поставляться по отдельным заказам.

#### 3.5.1. Оптические детекторы

Оптические детекторы можно разделить на следующие классы [56]: абсорбционные, работающие в ультрафиолетовой области спектра (190—380 нм) — УФД; абсорбционные для видимой области спектра (380—800 нм) — ВИД-Д; инфракрасные детекторы (800—5000 нм) — ИКД; рефрактометрические различных типов — РМД; эмиссионные, флуориметрические различных конструкций — ФМД; хемилюминесцентные — ХЛД. 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, высокий 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, достаточно удобными в работе, обеспечивающими возможность выбора длин волн.

Чувствительность УФД может достигать до 0,001 е.о.п. 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 УФД позволяет анализировать как примеси, так и основные компоненты на одной хроматограмме.

Фотометрические детекторы, в свою очередь, подразделяют на детекторы с фиксированной длиной волны (УФД), детекторы со сменной с помощью фильтров длиной волны или фильтровые фотометры (ФУФД) и спектрофотометрические детекторы с детектированием в определенной области длин волн (СПФ).

Наиболее простые и дешевые УФД широко применяют в высокоэффективных жидкостных хроматографах, особенно в 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 длине волны 254 нм высоким поглощением обладают многие органические соединения (ароматические, гетероциклические, кетоны и др.).

В УФД 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. Такие ячейки подходят главным образом 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 следующие методы подключения сравнительных ячеек: статический, при заполнении сравнительной ячейки чистым растворителем; динамический, путем разделения потока от насоса на 2 части и пропускания одного из них через рабочую, а другого через сравнительную колонку и сравнительную ячейку; динамический, с использованием дополнительного насоса низкого давления для пропускания через ячейку того же растворителя; динамический, путем подсоединения сравнительной ячейки между сосудом с растворителем и насосом в зоне всасывания, а рабочей ячейки — после разделительной колонки.

На рис. III.19 приведена принципиальная схема монохроматического УФД фирмы «Du Pont» (США). УФ-свет с длиной волны 254 нм от ртутной лампы низкого давления 4 проходит через проточную ячейку 3, ограниченную кварцевыми окнами 2, и попадает на фотоприемник 1. Свет также проходит через нейтральный фильтр 5 на сравнительный фотоприемник 6. Сигналы с фотоприемников 1 и 6 поступают на логарифмический усилитель, который выдает дифференциальный сигнал в зависимости от концентрации пробы. Сигнал записывается регистратором.

Одной из основных проблем конструирования фотометрических детекторов является обеспечение возможности фотометрирования в достаточно широком диапазоне длин волн. Это необходимо не только для получения максимальной чувствительности на длине волны, соответствующей ширине полосы максимального поглощения вещества, но и для значительного снижения чувствительности, облегчающего линейное детектирование высоких концентраций 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.

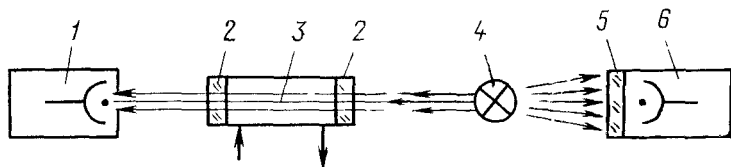


Рис III 19 УФД фирмы «Du Pont» (США)

1 6 — фотоприемники 2 — кварцевые окна 3 — проточная ячейка 4 — источник УФ излучения, 5 — фильтр

Некоторые источники излучения имеют линейчатый спектр (например, ртутная лампа — 254; 303; 313; 365; 464; 436; 546 нм и т. д.), другие — непрерывный спектр (например, дейтериевая лампа — 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 УФД 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 УФД, 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.

Учитывая вышеизложенное, применение УФД с дейтериевой лампой в качестве источника света и набором широкополосных фильтров с целью создания относительно дешевого 2—4-волнового

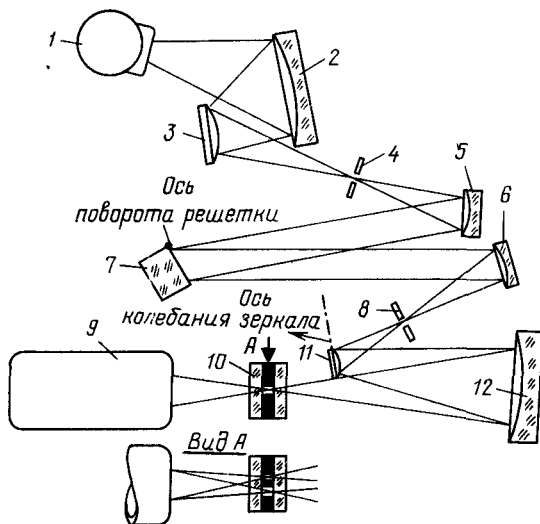


Рис III 20. Оптическая схема СПФ хроматографа «Милихром»:

1 — источник УФ излучения, 2, 3, 5, 6, 11, 12 — зеркала, 4, 8 — щели, 7 — решетка, 9 — фотоумножитель, 10 — ячейки детектора

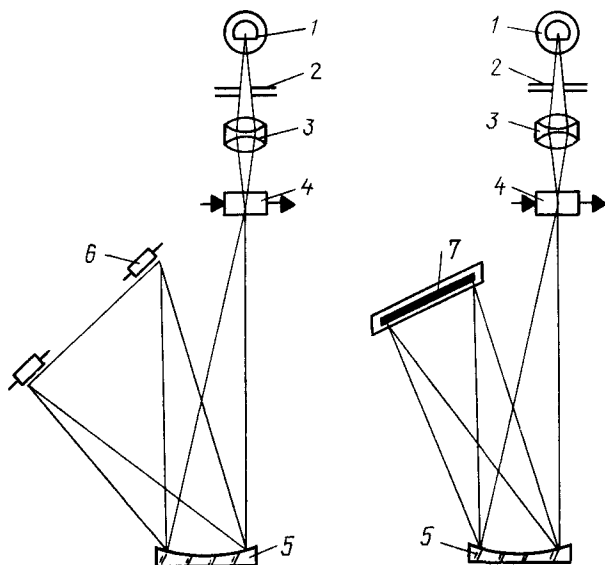


Рис. III.21. Фотодиодные УФ-детекторы для жидкостной хроматографии с механическим движущимся фотодиодом (а) и с фотодиодной матрицей (б):

1 — источник УФ излучения, 2 — диафрагма, 3 — конденсор, 4 — проточная ячейка, 5 — дифракционная решетка, 6 — фотодиод, 7 — фотодиодная матрица

УФД с выбором длин волн в диапазоне 200—300 нм, является наиболее перспективным.

Рассмотрим принцип действия и возможности спектрофотометрических детекторов на примере СПФ микроколоночного жидкостного хроматографа «Милихром-5» («Фосфат»). Оптическая схема СПФ приведена на рис. III.20. Детектор предназначен для фотометрирования элюата, выходящего из хроматографической колонки, при различных длинах волн в спектральном диапазоне 190—360 нм. СПФ состоит из источника света, монохроматора и фотометра. В качестве источника света 1 использована дейтериевая лампа ДДС-30. Изменение длины волны осуществляется поворотом дифракционной решетки монохроматора 7 (3600 штрихов на 1 мм) с помощью шагового двигателя. Монохроматический световой пучок, управляемый вибратором, поочередно проходит через рабочую и сравнительную проточные ячейки 10.

Одним из перспективных направлений развития фотометрических детекторов является применение фотодиодной матрицы. Оптические схемы двух типов фотодиодных УФ-детекторов приведены на рис. III.21. В таких детекторах непрерывное излучение источника 1 проходит через проточную рабочую ячейку 4 и попадает на дифракционную решетку 5. Луч отклоняется и фокуси-

руется на плоскости, где расположен механически движущийся фотодиод 6, сканирующий спектр по мере движения вдоль него, или фотодиодная матрица 7. В последнем случае спектр проецируется на матрицу, состоящую из 200—250 элементарных фотодиодов, и выдает информацию сразу обо всем диапазоне длин волн с дискретностью 2—5 нм. Постоянная времени системы с 200 фотодиодными элементами должна быть не более 40 нс. В связи с тем, что при регистрации спектра в диапазоне длин волн от 200 до 600 нм создается массив информации около 1000 К для аналитической и около 5000 К для микроколоночной жидкостной хроматографии при ширине пика на половине высоты менее 1 с, обработка и запись спектров проводится с помощью быстродействующих компьютера и регистратора.

Фотодиодный матричный детектор модели HP-1040A фирмы «Hewlett — Packard» (США) имеет 211 диодов шириной 50 мкм каждый и позволяет получить за время одного анализа до 200 хроматограмм.

К фотометрическим детекторам относится также детектор, работа которого основана на поглощении света в инфракрасной области спектра (ИКД). Некоторые функциональные группы органических соединений имеют характеристические частоты в ИК-спектрах этих соединений, поэтому ИКД пригоден для идентификации органических соединений. Одним из основных условий работы ИКД является прозрачность применяемых растворителей в ИК-области спектра. Наиболее подходящими, однако редко применяемыми в хроматографической практике, растворителями являются  $\text{CCl}_4$ ,  $\text{CHCl}_3$  и  $\text{CS}_2$ .

Адсорбция ИК-света 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 высокоэффективную жидкостную хроматографию. На рис. III.22 приведена схема современного ИКД. Свет от источника 1 проходит через обтюратор 2 и диск 3 с укрепленными на нем тремя интерференционными фильтрами на диапазоны 2,5—4,5; 4,5—8,0 и 8,0—14,5 мкм. Диск

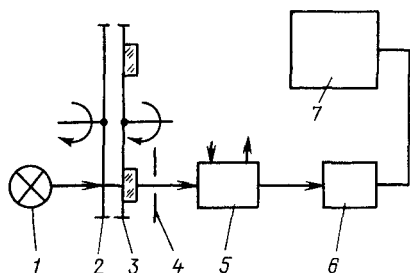


Рис III.22 ИК-детектор для современного хроматографа

1 — источник света 2 — обтюратор 3 — поворотный диск с фильтрами, 4 — щель 5 — ячейка детектора, 6 — детектор 7 — усилитель и регистратор



вращается и любой из фильтров может быть легко установлен на пути луча света. Монохроматический ИК-свет после фильтра проходит через щель 4 и затем через ячейку детектора 5, которая обычно имеет длину оптического пути около 1,0 мм. Прошедший ячейку свет попадает на термоэлектрический детектор 6, сигнал которого усиливается усилителем 7.

Для всех соединений, имеющих одинаковые функциональные группы, показания ИКД примерно одинаковы. В связи с независимостью показаний от молекулярной массы анализируемых соединений, ИКД имеет значительные преимущества по сравнению, например, с РМД. Молярные показания ИКД практически постоянны. Детектор достаточно стабильно работает при повышенных температурах ( $\approx 150^\circ\text{C}$ ) ячейки. В оптимальных условиях детектор может чувствовать около 1 мкг вещества с молекулярной массой 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 РМД.

В научной литературе описано несколько систем, объединяющих жидкостный хроматограф с ИК-спектрометром, использующим преобразование Фурье [56]. Такая система позволяет, например, одновременно записывать пять хроматограмм на пяти выбранных оператором полосах ИК-спектра. Система 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 вычислительной техники.

Для фотометрических детекторов в настоящее время ведется поиск новых источников излучения, конструкций проточных ячеек, методов регистрации и обработки сигналов. Эти исследования, несомненно, приведут к распространению применения фотометрических детекторов на новые области.

### 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 (РМД) являются универсальными детекторами в жидкостной хроматографии [56, 69]. Принцип действия РМД 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. РМД обладает средней чувствительностью,

а его показания в сильной степени зависят от колебаний параметров, влияющих на состав подвижной фазы, таких как давление, температура и концентрация анализируемого вещества. Поэтому РМД практически непригоден для градиентной хроматографии.

В некоторых случаях могут быть выбраны пары растворителей, имеющие близкие показатели преломления. При этом становится возможным осуществить градиентное элюирование в определенных пределах концентрации смеси растворителей.

Чувствительность РМД к изменениям температуры составляет для разных растворителей от  $5 \cdot 10^{-4}$  до  $5 \cdot 10^{-5}$  единиц показателя преломления (е.п.п.) на  $1^\circ\text{C}$ , а к изменениям давления —  $(1-5) \cdot 10^{-4}$  е.п.п./МПа. Чувствительность к температуре РМД обуславливает специальные меры по стабилизации температуры самого детектора и подвижной фазы при входе в детектор. В этом случае применение более длинных соединительных трубок (теплообменников) на входе в детектор приводит к высокому экстраколонульному расширению пиков и снижает достигнутую в колонке эффективность разделения. С целью стабилизации потока элюента и сорбируемости примесей в колонке желательно применять термостатирование колонки в хроматографах с РМД. Для реализации максимальной чувствительности РМД на уровне  $10^{-8}$  е.п.п. точность термостатирования колонки должна быть не более  $\pm 0,01^\circ\text{C}$ . При хорошем термостатировании РМД относительно нечувствителен к изменениям расхода подвижной фазы. Детектор достаточно прост, удобен в работе, неdestructивен и дает высокую воспроизводимость показаний.

Единственным недостатком детектора является его нечувствительность к веществам, имеющим показатель преломления, одинаковый с растворителем.

Работа большинства современных РМД основана на трех различных принципах измерения сигнала: отклонении, отражении и интерференции.

В первом методе угол отклонения монохроматического света, проходящего через проточную оптическую ячейку, пропорционален концентрации пробы и контролируется электромеханическим устройством, движение которого преобразуется в электрический сигнал. Принципиальная оптическая схема такого РМД приведена на рис. III.23. Луч света от лампы 1, проходя через конденсор 2 и растровую решетку 3, попадает в дифференциальную ячейку 5. Пройдя ячейку, свет отражается от автоколлимационного зеркала 6 и поступает на растр 8 и фотоприемник 9. Линза 4 служит для формирования изображения растра 8 и для образования параллельного пучка света, проходящего через ячейку. Плоскопараллельная пластина 7 смещает луч света при установке нулевой линии прибора. Наличие растров 3 и 8 в оптической схеме позволяет усилить сигнал, снимаемый с фотоприемника при малых

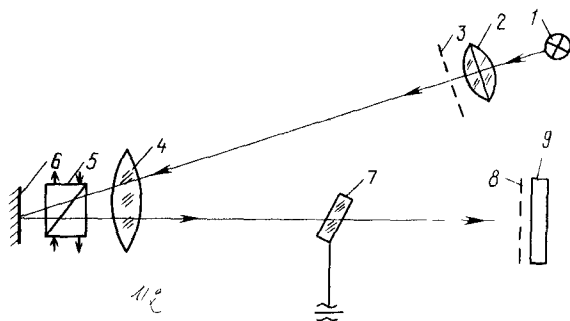


Рис III 23 Оптическая схема РМД хроматографа ХЖ-1307

1 — лампа 2 — конденсор 3 — растровые решетки 4 — линза 5 — дифференциальная ячейка  
6 — автоколлимационное зеркало 7 — пластина смещения луча, 9 — фотоприемник

отклонения луча. Растры выполнены так, что при отклонении луча, передающего изображение раstra 3 на растр 8, совмещаются темновые полосы в правой части раstra и расходятся световые и темновые полосы в его левой части. Сигнал, регистрируемый фотоприемником, пропорционален числу полос раstra. Питание на фотоприемник 9 подают от стабилизированного блока питания.

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 РМД, поэтому они более пригодны для градиентного элюирования. Так как детектирование происходит на границе раздела жидкости и стекла, для получения стабильной работы детектора необходимо следить за чистотой стекла.

РМД, оптическая схема которого представлена на рис. III.24, относится к рефрактометрам френелевского типа. Детектор состоит из следующих основных узлов (рис. III.24): источника света 1, конденсора 4, дифференциальной ячейки 12, стеклянных стержней 7, линзы 8 и фотоприемника 9. Кроме того, в состав детектора входят теплообменники и диафрагма для регулирования силы светового потока. Осветитель, основными элементами которого являются источник света и инфракрасный блокирующий фильтр, предназначен для создания светового потока в видимой части спектра. Конденсор 4 предназначен для формирования плоского пучка света, падающего на ячейку. Основными элементами конденсора являются линза и рычаг привода 3 (рис. III.24,б).

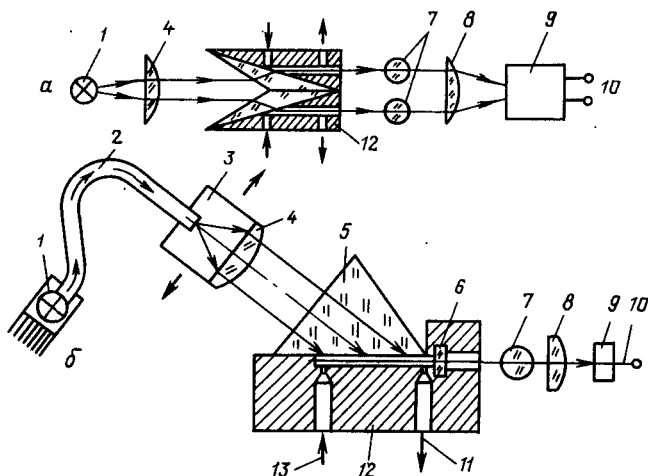


Рис. III.24. Оптическая схема РМД хроматографа «Цвет-305»

*a* — принципиальная конструкция (вид сверху); *б* — то же (вид спереди): 1 — источник света; 2 — световод; 3 — рычаг; 4 — конденсор; 5 — призма; 6 — защитное стекло; 7 — стеклянные стержни; 8 — линза; 9 — фотоприемник; 10 — к усилителю; 11 — выход потока элюента; 12 — корпус дифференциальной ячейки; 13 — вход потока элюента

Ячейка рефрактометра 12 изготовлена из нержавеющей стали, герметизируется защитными стеклами 6, призмой 5 и фторопластовыми прокладками. Через призму 5 свет подводится к ячейке, а через защитные стекла 6 выводится из нее. Призма изготовлена из стекла с показателем преломления  $n=1,5163$ . Стеклянные стержни 7 и линза 8 фокусируют прошедшие через ячейки световые потоки на светочувствительные элементы фотоприемника 9. Фокусировка позволяет устранить перекрывание световых потоков, которое может привести к дифференцированию хроматографических пиков.

Работа РМД третьего типа основана на интерферометрическом принципе сдвига. Схема такого РМД фирмы «Optilab» (Швеция) приведена на рис. III.25. Лучи света от источника 1 видимой области спектра разделяются делителем 2 на две части, фокусируются линзой 3 и проходят через рабочую и сравнительную

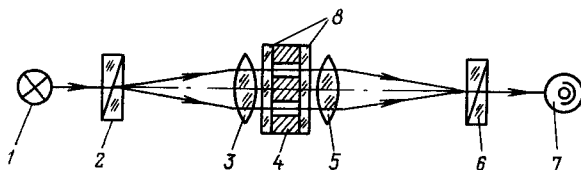


Рис. III.25. Оптическая схема РМД фирмы «Optilab» (Швеция):

1 — источник света; 2, 6 — делители; 3, 5 — линзы; 4 — ячейка; 7 — чувствительный элемент; 8 — кварцевые стекла

ячейки объемом 5 мкл. Лучи света затем объединяются с помощью линзы 5 и делителя 6 и попадают на чувствительный элемент 7.

Различие показателей преломления рабочего и сравнительного потока элюента приводит к разнице в длине оптического пути, которая измеряется интерферометрическим РМД как изменение длин волн света. Показания этого типа РМД достаточно линейны, а чувствительность в 10 раз выше, чем для других РМД. При оптимальных рабочих условиях возможно детектирование около 3 мкг/мл растворенного вещества. РМД может детектировать любой тип анализируемых веществ, независимо от температуры кипения, структуры, молекулярной массы и других физико-химических свойств. Предел обнаружения для лучших РМД достигает  $10^{-8}$  е.п.п., шум в 100 раз выше шума УФ-детектора. Детектор хорошо применим в тех случаях, когда нет необходимости в высокой чувствительности, например в препаративной хроматографии.

### 3.5.3. Флуориметрические детекторы

Принцип действия флуориметрического детектора (ФМД) 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, ФМД более чувствительны по сравнению с детекторами поглощения.

Для измерения обычно используют два типа конструкций ФМД, представленные на рис. III.26. Свет от УФ-источника излучения 1 проходит через фильтр 2 и фокусируется в проточной ячейке 3 с прямоугольной (рис. III.26,а) или линейной (рис. III.26,б)

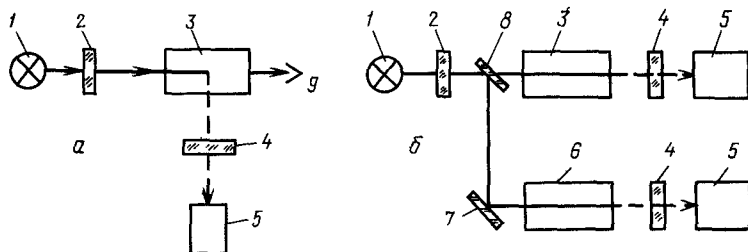


Рис. III.26. Прямоугольная (а) и линейная со сравнительной ячейкой (б) конструкции флуориметрических детекторов:

1 — источник света, 2, 4 — фильтры, 3 — проточная рабочая ячейка, 5 — фотоприемник, 6 — сравнительная ячейка, 7, 8 — полупрозрачные зеркала, 9 — ловушка света. Сплошная линия — свет возбуждения, пунктирная — свет эмиссии

конструкцией ввода и вывода света эмиссии. Излучение проходит также через фильтр 4 и измеряется с помощью фотоприемника 5. При применении ФМД подвижная фаза (растворитель) не должна поглощать свет ни на длине волны поглощения, ни на длине волны излучения.

Для сильно флуоресцирующих веществ предел детектирования достигает  $10^{-9}$  г/мл. При соответствующем выборе системы растворителей ФМД пригоден для использования в градиентной хроматографии. С помощью ФМД с высокой чувствительностью можно детектировать аминокислоты, амины, витамины и стероиды. Высокая чувствительность является одним из главных его преимуществ. ФМД можно также применять для количественного определения микропримесей веществ и качественного определения ароматических углеводов, биологически активных соединений, метаболитов и других флуоресцирующих соединений [56, 57, 65, 66].

Значительное увеличение чувствительности ФМД может быть получено при применении вместо ртутной лампы монохроматического лазера и гибких оптических световодов для введения света непосредственно в проточную ячейку малых размеров [74]. При введении конца световода непосредственно в кварцевую капиллярную ячейку на выходе из хроматографической колонки и облучении ее несколько выше по ходу потока с помощью Аг-ионного лазера под углом  $90^\circ$  получена чувствительность на уровне десятков пг для некоторых лекарственных препаратов [65]. Предложен также лазерный ФМД с двухфотонной наведенной флуоресценцией. Использование импульсного лазера в качестве источника возбуждения позволяет селективно детектировать только те соединения, время жизни флуоресценции которых больше скважности импульсов [66].

Предложен флуоресцентный метод детектирования, основанный на возбуждении молекул пробы  $\beta$ -частицами от  $^{63}\text{Ni}$ -радиоактивного источника, так называемый детектор  $\beta$ -индуцированной флуоресценции. Во фторопластовой проточной ячейке на длине 5 см размещена медная проволока, электролитически покрытая  $^{63}\text{Ni}$  [73].

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 рН подвижной фазы после колонки дает возможность увеличить флуоресценцию некоторых соединений и делает ФМД 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 пика и провести идентификацию анализируемых соединений.

В случае применения дискретных источников возбуждения для ФМД может быть получена более высокая интенсивность флуоресценции, большая воспроизводимость и меньший предел детектирования. Кроме Hg-лампы на 254 нм, применяют Zn-лампу на 214 и 308 нм и Cd-лампу на 229 и 326 нм. Предел детектирования для сильно флуоресцирующих веществ доведен до  $5 \cdot 10^{-10}$  г.

### 3.5.4. Электрохимические детекторы

В высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) наряду с широким применением оптических детекторов за последние 10—15 лет наметился значительный прогресс в развитии электрохимического метода детектирования. Доказательством этого является увеличение числа публикуемых работ по разработке и применению электрохимических детекторов (ЭХД) и, главным образом, увеличение выпуска аппаратуры, пригодной для практического использования [56, 59].

Благодаря высокой чувствительности и селективности, ЭХД особенно эффективен 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. ЭХД применяют также для анализа веществ при исследовании загрязнений окружающей среды ввиду его высокой чувствительности и селективности к фенолам, бензидинам, нитросоединениям, ароматическим аминам и пестицидам.

Наибольшее применение ЭХД нашел 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.

**Вольтамперометрический детектор (ВАД)** применяют для анализа широкого круга неорганических и органических веществ. Большинство неорганических ионов могут быть электрохимически окислены или восстановлены. Среди органических соединений электроактивными являются соединения с кратными связями, окисляемыми или восстанавливаемыми функциональными группами, ароматические и другие соединения.

Поскольку для каждого класса электроактивных соединений характерен определенный потенциал окисления или восстановления, этот потенциал и определяет селективность детектора. На практике метод окисления осуществить проще, так как из элюента

и из пробы не надо удалять растворенный кислород. В детекторе имеется по крайней мере два электрода — рабочий и сравнительный, по отношению к которому устанавливается потенциал рабочего электрода. В качестве сравнительного чаще всего используют каломельный или хлорсеребряный электроды. В некоторых детекторах дополнительно устанавливают вспомогательный электрод, необходимый для подавления влияния омического падения напряжения в растворах низкой проводимости. Вольтамперометрические, полярографические и некоторые типы кулонометрических детекторов измеряют ток как функцию времени при постоянном напряжении на электродах.

В качестве материалов электродов используют ртуть, платину, золото, серебро, графит, угольную пасту и др.

Сигнал ВАД измеряется как ток при постоянном потенциале на электродах и зависит от гидродинамических условий работы рабочего электрода. Большинство обычных твердых электродов имеет плоскую тонкослойную гидродинамическую систему или систему «стенка — сопло», с которыми легче получить рабочий объем ячейки менее 1 мкл. Электроды в тонкослойной ячейке располагают часто в промежуточном канале параллельно потоку. Некоторые типы рабочих электродов ЭХД представлены на рис. III.27. Разработаны конструкции ВАД с малым объемом для работы с микро- и капиллярными колонками.

Для увеличения чувствительности и селективности ВАД предложены конструкции с двумя рабочими электродами, расположенными последовательно или параллельно в потоке элюента. Электроды имеют разные потенциалы.

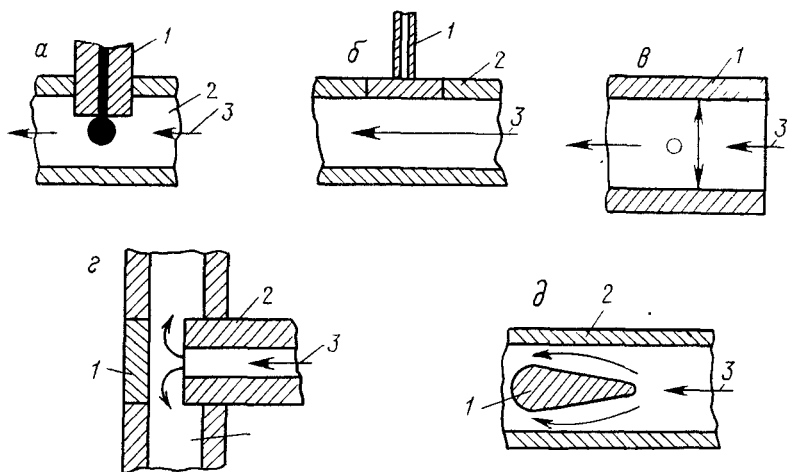


Рис. III.27 Некоторые типы рабочих электродов электрохимического детектора: а — сферический, б — плоский, в — цилиндрический, г — типа «стенка — сопло», д — конический, 1 — рабочий электрод, 2 — ячейка, 3 — поток элюента



Детектирование при потенциалах более  $+1\text{В}$  или менее  $-1\text{В}$  (относительно  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ -электрода) с использованием угольных или ртутных электродов приводит к уменьшению чувствительности и селективности ВАД при работе с водными элюентами. Для высокочувствительного детектирования соединений с высокими окислительно-восстановительными потенциалами используют другой принцип работы ВАД с двумя рабочими электродами: генераторным и детекторным, соединенным последовательно. Генераторный электрод имеет потенциал, достаточный для электролиза анализируемого вещества. Расположенный ниже по потоку элюента детекторный электрод имеет другой потенциал, достаточный для детектирования продуктов электролиза генераторного электрода. Анализируемое вещество должно быть электроактивным и способным образовывать продукты реакции, детектируемые при низких потенциалах электрода, при которых чувствительность и селективность достаточно высоки.

Разработан ВАД с тонкослойной ячейкой, имеющий два рабочих электрода, расположенных параллельно и напротив друг друга.

**Полярографический детектор (ПГД)** с ртутным капаящим электродом для ВЭЖХ был предложен в 1958 г., однако его использование ограничено. ПГД измеряет силу электрического тока между поляризуемым и неполяризуемым электродом при заданной постоянной разности потенциалов. При работе в режиме восстановления из элюента и из пробы необходимо удалить растворенный кислород и примеси металлов.

ПГД применяют для определения нитроанилинов, нитрофенолов, хлорнитробензолов, нитроалканов, нитронафталинов, *n*-метоксиазобензолов, *N*-нитрозоаминов, стероидов.

**Кулонометрический детектор (КМД)** назван так в связи с тем, что анализируемые вещества в нем электризуются полностью в отличие от ВАД, где эффективность электролиза менее 10%. В КМД 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 ВАД — КМД позволяет провести селективное детектирование неразделенных пиков.

Фирма «ESA» (США) выпускает КМД, обладающий высокой чувствительностью, селективностью и стабильностью. Два рабочих электрода из пористого графита, расположенные в проточной ячейке объемом 5 мкл, обеспечивают большую площадь поверхности электродов при электрохимических реакциях. Электроды

расположены в ячейке, так что элюент течет сквозь электрод, а не рядом с ним, поэтому почти 100% анализируемого вещества вступает в реакцию при скоростях элюента до 4 мл/мин.

Преимуществами ЭХД являются простота конструкций, низкая стоимость, высокая чувствительность и селективность. Имеется возможность регулирования селективности путем смены режимов работы детекторов, замены или модифицирования электродов. Для ЭХД можно реализовать рабочий объем около 1 нл, меньший по сравнению с другими ВЭЖХ-детекторами. ЭХД с малым рабочим объемом может быть применен в микроколоночной и капиллярной хроматографии, что особенно актуально в связи с их быстрым развитием. Преимуществом ЭХД является также малая зависимость показаний от температуры.

Недостатками ЭХД являются уменьшение чувствительности со временем в связи с изменением характеристик электродов, применение ртути в некоторых типах ЭХД, значительная зависимость сигнала от расхода элюента и ограниченное применение в ВЭЖХ с градиентным элюированием.

### 3.5.5. Масс-спектрометры в качестве детекторов

Одним из основных методов количественного детектирования и идентификации анализируемых соединений в жидкостной хроматографии является метод, в котором используют стандартный масс-спектрометр (МС) высокого разрешения и достаточного быстродействия в качестве детектора [56].

При решении достаточно сложной проблемы ввода потока элюента в МС наметилось несколько подходов, основными из которых являются применение 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 МС, например около 500—600 л/мин.

На рис. III.28 представлена схема системы напуска пробы в МС модели 4000 фирмы «Finnigan» (США). Элюент из колонки наносится специальным устройством 2 на движущуюся ленту 10, на которой испаряют растворитель в зоне испарения элюента 3, а затем в вакуумной камере в зоне испарения пробы 7 происходит быстрое её испарение. Проба через диафрагму попадает в ионный источник МС 8. Лента затем очищается в зоне очистки 6 и снова подается к узлу нанесения элюента 2 с помощью привода 1 двигателя.

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 эффектив-

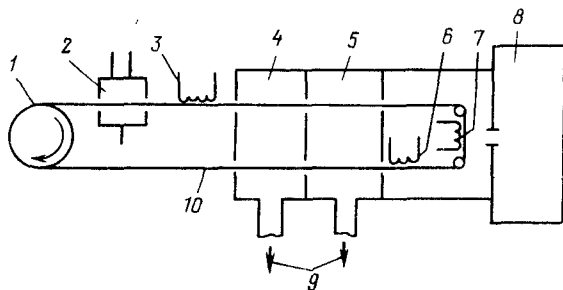


Рис III 28. Схема транспортного устройства фирмы «Finnigan» (США) для соединения жидкостного хроматографа с масс-спектрометром:

1 — привод ленты 2 — узел нанесения слоя элюента на ленту, 3 — зона испарения, 4 — 5 — вакуумные камеры, 6 — зона очистки ленты, 7 — зона испарения пробы, 8 — масс-спектрометр, 9 — к вакуумным насосам (500 л/мин), 10 — лента из нержавеющей стали ( $3,2 \times 0,05$  мм)

но 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 хроматографии составляет в среднем около 1 мл/мин, такое разделение потока уменьшает количество поступающей в МС пробы в 100 раз.

Экстраколоночное расширение пиков (ЭКР) в системе фирмы «Finnigan» сравнимо с ЭКР для УФД с объемом проточной ячейки 0,3 мкл. Такой МС является детектором с достаточно низким эффективным рабочим объемом и пригоден для прямого объединения с микроколонками внутренним диаметром 0,5 мм. Постоянная времени МС около 0,1 с.

Развитие микроколоночной и капиллярной ВЭЖХ обуславливает разработку системы прямого ввода потока элюента в ионный источник МС. При этом, кроме высокопроизводительных систем откачки, как правило, требуется дополнительное вымораживание элюента. Показано, что оптимальные расходы элюента при прямом вводе в МС должны составлять 3—30 мкл/мин, что характерно для колонок внутренним диаметром 0,5—1 мм, заполненных сорбентом с размером частиц 5—10 мкм. Так как ЭКР в общем случае не должно превышать 50% от расширения пика в колонке, современные системы ВЭЖХ — МС наряду с обеспечением уже достигнутого уровня чувствительности и линейности детектирования в жидкостной хроматографии, должны иметь рабочий объем 0,1—1 мкл и ЭКР не более 1 мкл. Для получения оптимальных характеристик МС необходимы дальнейшие исследования по определению оптимальной скорости откачки паров элюента в вакууме, влияния параметров переходных устройств и типа элюента на работу МС.

Для прямого ввода потока растворителя в МС применяют также специальную камеру, размещенную на выходе. Область

дрейфа электрически заряженных капелек элюента сконструирована таким образом, чтобы сфокусировать их в ионном источнике МС. 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 [58].

### 3.5.6. 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.

Применяют две принципиально отличные конструкции детекторов радиоактивности (РАД) для жидкостной хроматографии [56]. 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 РАД использованы проточные ячейки сцинтилляционных счетчиков, заполненные частицами твердых сцинтилляторов. Например, для обнаружения  $\beta$ -излучения в потоке элюента применяли твердые сцинтилляторы в виде стеклянных шариков, содержащих от 2,5 до 7,7% Li с общей массой около 0,5 г. Обычно проточные ячейки для РАД изготавливают из стекла или фторопласта.

Наибольшую трудность при применении РАД представляет обеспечение необходимой скорости счета, которая прямо пропорциональна рабочему объему детектора и обратно пропорциональна расходу потока элюента. РАД 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  $V$  и уменьшении расхода потока элюента  $W$  чувствительность РАД при прочих равных условиях увеличивается. Однако эти изменения приводят к ухудшению достигнутого на колонке разрешения. С уменьшением  $V$  при постоянном  $W$  и при сохранении эффективности разделения падает чувствительность детектора. Пропорциональное изменение  $V$  и  $W$  в сторону их уменьшения или увеличения не изменяет чувствительность детектора, что означает одинаковую чувствительность и универсальность применения его как в аналитической, так и в препаративной хроматографии.

Рекомендуется, чтобы объем ячейки РАД был не более 0,1 объема первого пика хроматограммы анализируемой смеси.

При применении твердых сцинтилляторов эффективность счета составляет 6% для  $^3\text{H}$ , 10% для  $^{32}\text{P}$ , 70% для  $^{14}\text{C}$  и 7% для  $^{123}\text{I}$ . В этом случае эффективность счета зависит также и от размера частиц сцинтиллятора. Уровень шума соответствует количеству  $^3\text{H}$  в пробе  $(2-6) \cdot 10^{-14}$  моль.

Преимуществами РАД являются хорошая воспроизводимость показаний, большой линейный диапазон детектирования, нечувствительность к изменениям потока элюента и в связи с этим применимость при градиентном элюировании, низкий предел детектирования (около 100 счетных единиц в 1 мин для  $^{14}\text{C}$ ), применимость в препаративной хроматографии и для большого числа  $\beta$ -,  $\alpha$ - и  $\gamma$ -радиоактивных элементов. РАД применяют для анализа  $^{131}\text{I}$ ,  $^{210}\text{Po}$ ,  $^{125}\text{Sb}$  с использованием счетчика Гейгера [56].

Ряд зарубежных фирм, такие как «Shandon» (Англия) и «Packard» (США), выпускают РАД серийно.

### 3.5.7. Детекторы светового рассеяния

Детектор по измерению светового рассеяния (СРД) основан на различии давлений паров обычно используемых в жидкостной хроматографии растворителей и анализируемых веществ [63, 64]. Принципиальная схема детектора приведена на рис. III.29. Элюент на выходе из колонки распыляется в камере 5 при повышенной температуре. В камере испарения 8 растворитель испаряется, а поток частиц нелетучих анализируемых веществ рассеивает свет лазерного луча в камере светорассеяния 10, в которой имеется стеклянный стержень 14, расположенный перпендикулярно лучу лазера на расстоянии 2—5 мм от него. Стержень служит в качестве коллектора рассеянного света, через него часть рассеянного света попадает на фотоумножитель. Показания СРД пропорциональ-

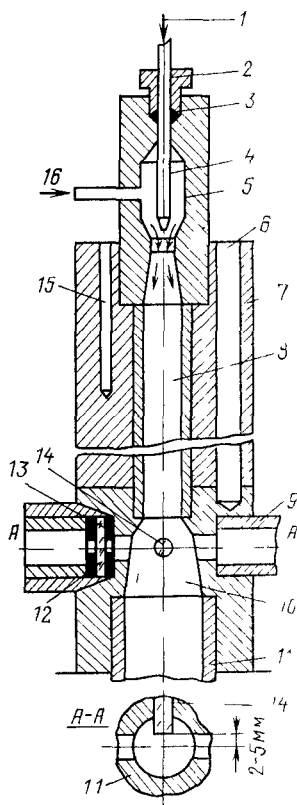


Рис III 29 Детектор светового рассеяния

1 — вход элюента, 2 — подводящая трубка, 3 — уплотнение, 4 — сопло, 5 — камера распыления, 6 — нагреватель, 7 — корпус детектора, 8 — камера испарения, 9 — трубка для выхода луча, 10 — камера светорассеяния, 11 — трубка для выхода потока частиц, 12 — стеклянное окно, 13 — двойная диафрагма, 14 — стеклянный стержень, 15 — измеритель температуры, 16 — вход потока газа

ны массовой скорости потока вещества, что особенно важно при использовании его с колонками малого диаметра. Фоновый ток СРД при включенном лазере и установленном потоке предварительно нагретого несущего газа ( $\text{CO}_2$ ) около  $2 \cdot 10^{-10}$  А, шум —  $1,10^{-11}$  А. Вклад СРД в ЭКР от 0,1 до 0,2 мкл. Нулевая линия стабильна даже при применении высокого градиента концентрации; линейный диапазон невысок (около 100), однако показания пропорциональны массовому потоку анализируемого вещества в степени 1,8. Предел детектирования для метиловых эфиров жирных кислот и триглицеридов в различных пробах около 150 нг/с. Основным требованием является условие, чтобы анализируемые вещества были жидкими или твердыми при температуре детектора.

### 3.5.8. Газохроматографические детекторы

С развитием метода ВЭЖХ потребовались новые типы детекторов, обладающие высокой чувствительностью и селективностью. Использование хроматографических колонок с внутренним диаметром 0,5—1 мм в микроколоночной хроматографии с оптимальным расходом элюента 5—100 мкл/мин дало возможность прямого их соединения с газохроматографическими детекторами, такими как электронозахватный (ДЭЗ), пламенно-ионизационный и пламенно-фотометрический.

Особенно перспективно использование ДЭЗ 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 с внутренним диаметром 1 мм и длиной 200 мм, заполненной сорбентом силасорб-600 (ЧСФР) с размером частиц 10 мкм, может быть непосредственно соединен с ДЭЗ с помощью капилляра длиной 40—50 мм и внутренним диаметром 0,1 мм, вставленного в специальную переходную втулку. Втулка устанавливается на основание ДЭЗ вместо газохроматографической колонки и герметизируется с помощью уплотнения и накидной гайки [60].

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 составляли 100 см<sup>3</sup>/мин и 250 °С соответственно. Так как ДЭЗ является концентрационным детектором, при изменении расхода азота от 20 до 300 см<sup>3</sup>/мин его чувствительность уменьшалась, при этом уменьшалось ЭКР детектора. Изменение температуры ДЭЗ от 250 до 350 °С не влияло на чувствительность и эффективность анализа нитробензола и линдана.

Фоновый ток ДЭЗ пропорционально возрастает с увеличением расхода элюента в интервале 10—100 мкл/мин, в то время как чувствительность и эффективность уменьшаются. Возможно добавление полярного растворителя (например, 1—8% изопропанола) к гексану. Предел детектирования для нитробензола  $4,4 \cdot 10^{-11}$  г/см<sup>3</sup> или  $1,9 \cdot 10^5$  мВ·см<sup>3</sup>/мг; для линдана  $1,2 \cdot 10^{-12}$  г/см<sup>3</sup> или  $7,1 \cdot 10^6$  мВ·см<sup>3</sup>/мг. Снижение расхода элюента до значений менее 20 мкл/мин позволяет снизить расход промывочного газа до 20—50 см<sup>3</sup>/мин и дополнительно увеличить чувствительность метода. Перспективно использование микроколонок с внутренним диаметром 0,2—0,5 мм с размером частиц сорбента менее 5 мкм и расходом элюента менее 10 мкл/мин.

Детектор может быть успешно применен для анализа хлорсодержащих пестицидов, экстрагированных гексаном из воды. При этом может быть использована серийная отечественная аппаратура: газовый хроматограф модели 3700 с ДЭЗ в сочетании с микроколоночным жидкостным хроматографом «Милихром», микронасос которого позволяет устанавливать расход элюента 10—100 мкл/мин.

### 3.6. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ЖИДКОСТНЫЕ ХРОМАТОГРАФЫ

Изучение динамики роста характеристик аналитических жидкостных хроматографов позволяет сделать вывод о стабилизации в настоящее время основных характеристик приборов. Подавляющее большинство аналитических жидкостных хроматографов высокого разрешения имеет насосные системы с рабочим давлением не более 35—50 МПа (350—500 атм). Предполагается, что в ближайшие годы рост максимального рабочего давления наблюдаться не будет, а следовательно, сохранится уже сложившийся подход к построению систем подачи подвижной фазы. Однако развитие микроколоночной техники, появление сорбентов с размером зерен меньше 3 мкм требует высоких давлений. Например, прогнозируется уменьшение зернения сорбентов до 2 мкм, что влечет за собой увеличение максимального рабочего давления насосов.

Следовательно, значения параметров ВЭЖХ ограничены не конъюнктурными, а физическими причинами. Эти параметры характеризуют ЖХ всех ведущих фирм мира уже в течение срока, вдвое превышающего срок полного обновления моделей хроматографической аппаратуры на мировом рынке. В настоящее время развитие жидкостных хроматографов происходит по двум направлениям: 1) расширение функциональных возможностей за счет использования сервисных дополнительных устройств, методов управления, обработки данных; 2) использование принципиально новых методов и вариантов анализа веществ.

Реализация первого направления привела к созданию хро-

матографов третьего поколения. Примером является разделение компонентов на двух параллельных колонках, их регистрация с помощью многоканальных детекторов и многофункциональный анализ хроматографических данных, что позволяет обрабатывать хроматографические пики даже при их наложении. Математическая обработка обеспечивает независимость выходных данных от фона и флуктуаций, состава компонентов. Применение таких хроматографов перспективно при анализе сложных многокомпонентных смесей, но не приводит к повышению основных его параметров, например чувствительности.

Второе направление осуществляется путем исследования новых физических принципов детектирования и анализа. Например, применение возбуждаемой лазером двухфотонной флуоресценции позволило снизить предел обнаружения в 300—500 раз по сравнению с достигнутыми ранее значениями этого предела для серийных флуориметрических детекторов.

Для современного аналитического жидкостного хроматографического приборостроения характерны следующие особенности [62]:

- высокая скорость обновления выпускаемых приборов, например у ведущих зарубежных фирм полное обновление осуществляется примерно за 5 лет;

- сокращение числа типов выпускаемых приборов с переходом к выпуску единых унифицированных серий (типажей);

- уменьшение размеров приборов и сокращение числа основных функциональных блоков благодаря широкому использованию микроэлектронных компонентов и новых технологических процессов;

- повсеместный переход к использованию микропроцессорной и компьютерной техники для автоматизации всего цикла анализа, обеспечения обработки хроматографической информации и оптимизации параметров;

- создание новых и совершенствование известных универсальных и селективных детекторов с целью повышения линейного диапазона и чувствительности, улучшения погрешности и повторяемости;

- расширение аналитических возможностей за счет использования кварцевых капиллярных колонок, микроколонок, схем переключения колонок в сложных системах анализа, создания новых типов сорбентов;

- создание гибридных аналитических приборов путем объединения ЖХ с газовыми хроматографами, МС и другими приборами;

- более широкое применение аналитических, автоматических ЖХ для контроля технологических процессов;

- роботизация проведения рутинных анализов с использованием ЖХ и пробоподготовки.



### 3.7. КАПИЛЛЯРНЫЕ ЖИДКОСТНЫЕ ХРОМАТОГРАФЫ

С конца 70-х годов по аналогии с капиллярной газовой хроматографией (КГХ) начинает развиваться капиллярная жидкостная хроматография (КЖХ) на полых капиллярных колонках [61]. Очевидным преимуществом КЖХ 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 ПФ ( $0,1—1,0$  мкл/мин) и в связи с этим возможностью их прямого соединения с более чувствительными газохроматографическими детекторами (ДИП, ДТИ, ДПФ, ДЭЗ, ДФИ), масс-спектрометром, ИК-спектрометром с преобразованием Фурье и другими приборами физико-химического анализа. Продолжительность анализа регулируется длиной капиллярной колонки, которая за счет высокой эффективности может быть уменьшена для несложных проб. Первые работы в области КЖХ проводились на колонках внутренним диаметром  $30—100$  мкм. В связи с медленной диффузией анализируемых веществ в жидкой ПФ ( $D=0,2—2,0 \cdot 10^{-5}$  см<sup>2</sup>/с), для этих диаметров не может быть в полной мере реализована высокая эффективность кварцевых капиллярных колонок с привитыми ПФ. Однако даже в этом случае была получена эффективность около  $10^6$  теоретических тарелок (ТТ) с ячейкой ЭХД объемом около 1 нл и чувствительностью на уровне  $0,05$  пг. Разработанная Ноксом теория оптимального режима разделения в КЖХ позволила предсказать, что для реализации высокой эффективности ( $>10^5$  ТТ) при высокой скорости анализа необходимо, чтобы диаметр колонок был не более  $10$  мкм [61]. Создание кварцевых капиллярных колонок такого диаметра является достаточно сложной технологической задачей, однако еще большие сложности возникают при обеспечении малых ЭКР, рабочих объемов детекторов и объемов пробы, которые в общем случае должны быть не более 1 нл. 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.

В настоящее время уже испытаны колонки 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  $5 \cdot 10^4$  ТТ при продолжительности анализа менее  $6,5$  мин.

Одним из решений по увеличению потока через капиллярные колонки в КЖХ и, соответственно, снятия строгих ограничений для «мертвых» объемов в дозаторе, детекторе и соединительных коммуникациях является применение пучка капиллярных колонок внутренним диаметром  $\leq 10$  мкм или поликапиллярных колонок.

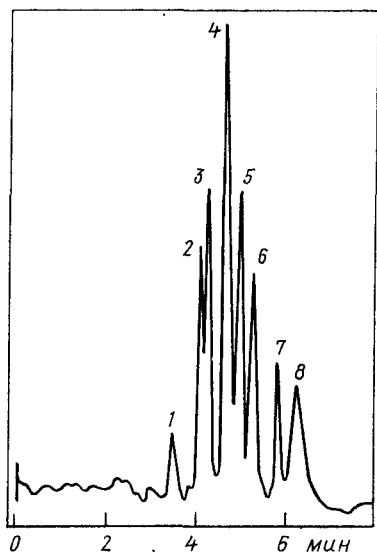


Рис. III.30. Хроматограмма разделения изомеров хлоранилина и хлортолуидина на полый капиллярной колонке внутренним диаметром 6 мкм:

1, 7, 8 — *о*- и *п*-хлоранилины, 2 — хлор-*н*-толуидин, 3, 5, 6 — *о*-, *м*-, *п*-толуидины, 4 — 4-хлор-*о*- и 6-хлор-*о*-толуидины. ПФ — *н*-гексан + ацетонитрил (0,7%) + метанол (0,7%) + дихлорметан (0,3%) + вода (0,01%), детектор УФД, 254 нм, длина колонки — 220 см, квазипокрывание силикагелем.

Кварцевая поликапиллярная колонка, содержащая до 3000 отдельных капилляров практически одинакового размера, разработана в СССР, однако трудности, связанные с равномерным нанесением привитой НФ и получением одинаковой эффективности во всех капиллярах, пока еще сдерживают применение таких колонок.

На рис. III.30 приведена хроматограмма разделения изомеров хлоранилина на полый капиллярной колонке с квазисиликагелевым покрытием длиной 220 см и внутренним диаметром 6 мкм, полученная на микро-УФД при 235 нм.

С точки зрения полной реализации высоких потенциальных возможностей и преимуществ КЖХ можно сформулировать следующие требования к аппаратуре для КЖХ: диапазон расходов и максимальное давление ПФ, создаваемые насосом, должны соответствовать оптимальной скорости потока ПФ 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; должно быть предусмотрено практически полное отсутствие «мертвых» объемов от дозатора до детектора.

**ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ****4.1. ПОДВИЖНЫЕ ФАЗЫ****4.1.1. Элюирующая сила и селективность**

Подвижная фаза в жидкостных хроматографических системах выполняет, как правило, двоякую функцию. С одной стороны, она (подобно подвижной фазе в газовой хроматографии) обеспечивает перенос десорбированных молекул по колонке. С этой точки зрения химические свойства подвижной фазы не играют существенной роли, более важны их физические параметры, такие как вязкость, летучесть и др. С другой стороны, в отличие от газохроматографических систем, подвижная фаза жидкостной хроматографии играет активную, химическую, по существу, роль. Молекулы подвижной фазы взаимодействуют с другими компонентами системы: молекулами разделяемых веществ и молекулами неподвижной фазы. Фактически константы сорбционного равновесия в системе определяются характером подвижной фазы ничуть не менее, чем особенностями сорбента. Более того, во многих случаях компоненты подвижной фазы способны к прочной сорбции, что приводит к образованию на поверхности сорбента слоя, существенно изменяющего свойства неподвижной фазы. Поэтому вторая и более важная функция подвижной фазы сводится к регулированию констант равновесия, к регулированию удерживания. Возможности регулирования удерживания с помощью подвижной фазы необычайно широки. Нередко заменой одного растворителя на другой можно изменить коэффициент емкости в 1000—10 000 раз. Однако для практической хроматографии пригоден лишь довольно узкий диапазон величин  $k'$  — примерно между 1 и 20. Слишком малые значения  $k'$  непригодны, так как в этой области резко возрастает вероятность взаимного перекрывания пиков. Наоборот, если константы сорбции и  $k'$  слишком велики, для разделения требуется много времени, к тому же увеличивается риск не обнаружить более прочно сорбирующиеся компоненты смеси.

Таким образом, для решения каждой конкретной задачи состав как подвижной, так и неподвижной фазы должен быть тщательно подобран с точки зрения физических и химических свойств ее компонентов.

Основными характеристиками подвижных фаз являются их элюирующая сила и селективность.

Подобно тому, как прочность сорбции различных веществ может сильно различаться, сильно различаются по своим свойствам и подвижные фазы, применяемые в ВЭЖХ. Одни из них

способны смыть с колонки лишь слабосвязанные сорбаты, другие же вызывают десорбцию почти любых молекул. Ясно, что состояние равновесия в системе в конечном итоге определяется балансом межмолекулярных взаимодействий. В частности, молекулы подвижной фазы могут взаимодействовать с молекулами разделяемых веществ. Образующиеся ассоциаты, хотя бы даже и очень нестойкие, почти неизбежно имеют сродство к сорбенту, отличающееся от сродства неассоциированных молекул. В результате ассоциации сорбция может стать менее или более прочной. С другой стороны, молекулы подвижной фазы могут конкурировать на поверхности сорбента с молекулами разделяемых соединений, вытесняя последние с активных центров и способствуя смещению равновесия в сторону десорбции.

Аналогично газовой хроматографии в жидкостной наиболее важны следующие типы межмолекулярных взаимодействий: дисперсионное, диполь-дипольное, образование водородной связи, а кроме того, электростатическое взаимодействие между разноименно заряженными ионами. Для характеристики влияния подвижной фазы на удерживание используют понятие элюирующей силы.

Обратимся к примеру. Пусть требуется разделить трехкомпонентную смесь веществ  $X_1, X_2, X_3$ . Исходя из каких-либо априорных соображений, мы выбрали неподвижную фазу и теперь необходимо выбрать подвижную. Испытав в качестве подвижной фазы растворитель  $A_1$ , мы получили хроматограмму без каких-либо признаков элюирования компонентов (рис. III.31, а). Можно применить ка-

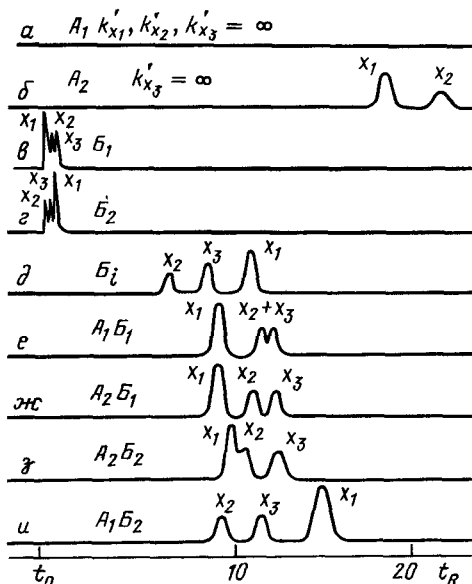


Рис III.31 К определению элюирующей силы и селективности растворителей

кой-либо другой растворитель  $A_2$  и получить хроматограмму, приведенную на рис. III.31,б. При этом обнаруживаем, хотя и слишком медленное, элюирование компонентов  $X_1$  и  $X_2$ , в то время как  $X_3$  сорбируется по-прежнему необратимо. Об обоих испытанных растворителях можно сказать, что они имеют явно недостаточную элюирующую силу. Взяв третий растворитель  $B_1$ , обнаружим, что компоненты смеси почти не удерживаются (рис. III.31,в). Такой же результат получаем с растворителем  $B_2$  (рис. III.31,г). В обоих последних случаях разделение  $X_1$ ,  $X_2$  и  $X_3$  неудовлетворительно, растворители имеют слишком большую элюирующую силу. Возможно, продолжая перебор растворителей, мы найдем, наконец, растворитель  $B_i$ , в котором удерживание и разделение приемлемо (рис. III.31,д), т. е. сила растворителя  $B_i$  близка к оптимальной. Естественно, причина разного действия растворителей  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_i$  при разделении данной смеси кроется в сложном комплексе межмолекулярных взаимодействий в системах разного состава.

Таким образом, мы можем сказать, что элюирующая сила подвижной фазы — это ее свойство вступать в такие межмолекулярные взаимодействия с компонентами системы, которые способствуют десорбции разделяемых соединений, более быстрому перемещению хроматографических зон. Конкретные физико-химические механизмы влияния растворителя на сорбционное равновесие различны в различных режимах ВЭЖХ.

Для выполнения транспортной функции в качестве подвижной фазы пригодны, вообще говоря, любые жидкости, достаточно хорошо растворяющие компоненты пробы, и выбор таких жидкостей довольно велик. Однако из приведенного примера ясно, что выбор растворителей подходящей элюирующей силы уже значительно меньше. К тому же, поиск их может осуществляться в основном методом проб и ошибок и, следовательно, весьма трудоемок. Многократное увеличение гибкости метода ВЭЖХ, обогащение его возможностей достигается за счет применения в качестве подвижных фаз смесей растворителей. Принцип составления таких смесей прост. Необходимо взять два индивидуальных растворителя, один из которых имеет заведомо недостаточную элюирующую силу, а другой — заведомо избыточную. Из этих двух основных растворителей можно приготовить множество различных подвижных фаз. Часть из них обязательно будет обладать подходящей элюирующей силой. Например, из наших растворителей  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $B_1$ ,  $B_2$  можно приготовить четыре бинарных смеси, обладающие подходящей элюирующей силой:  $A_1B_1$ ,  $A_2B_1$ ,  $A_2B_2$ ,  $A_1B_2$ . Соответствующие хроматограммы представлены на рис. III.31. Видно, что в среднем коэффициенты емкости компонентов  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  вполне приемлемы.

Сила растворителя является экспериментально определяемым интегральным параметром. Она отражает некоторую усредненную

способность данного вещества к межмолекулярным взаимодействиям различной природы. Когда мы говорим, что растворитель имеет подходящую силу, под этим имеется в виду, что на данном сорбенте данный сорбат будет иметь приемлемое значение  $k'$ . В то же время ясно, что для разделения уже двух соединений подойдет не любая из подвижных фаз, имеющих необходимую силу.

Вернемся к примерам, представленным на рис. III.31. На хроматограммах  $d$  —  $u$  все вещества имеют хорошее удерживание, однако удовлетворительными можно считать только хроматограммы  $d$ ,  $ж$ ,  $u$ . На хроматограммах  $e$  и  $з$  отдельные пары пиков имеют недостаточное разделение. В таких случаях мы говорим, что селективность системы недостаточна. Селективность системы, в которой используется данная неподвижная фаза, в первую очередь определяется селективностью используемой подвижной фазы. Селективность подвижных фаз связана с их способностью к специфическим взаимодействиям с сорбатами, обладающими определенными структурными признаками. Она проявляется в том, что точное значение элюирующей силы данного растворителя или смеси по отношению к сорбатам различного строения может быть различным. Селективность, как и элюирующая сила бинарной подвижной фазы, определяется в первую очередь природой более сильного ее компонента.

Описанный подход подбора состава подвижных фаз для ВЭЖХ является общепринятым. В составе почти любой подвижной фазы можно найти компонент сорбционно менее активный, выполняющий преимущественно транспортную функцию и сорбционно активный, который служит для регулирования равновесия. Обычно растворители первого рода обозначают символом  $A$ , растворители второго рода —  $B$ . Естественно, роль одного и того же компонента в различных подвижных фазах и в зависимости от характера неподвижной фазы может быть различна. Например, в подвижной фазе гексан — хлороформ последнее соединение выступает в качестве растворителя  $B$ , а в системе хлороформ — метанол оно же играет роль растворителя  $A$ .

С целью повышения селективности разделения часто используют подвижные фазы более сложного состава, чем бинарные смеси  $A + B$ , например  $A + B_1 + B_2$  или даже  $A + B_1 + B_2 + B_3$ . Во многих случаях это приводит к улучшению разделения, хотя, судя по опубликованным методикам, применение тройных или четырехкомпонентных подвижных фаз не всегда оправдано, особенно если разделяемая смесь не слишком сложна. При оценке перспектив применения сложных элюентов следует иметь в виду, что независимо от механизма разделения, если оно вообще возможно, разделение осуществляется наилучшим образом с помощью  $n$ -компонентного элюента, состоящего из растворителя  $A$  и  $n - 1$  различных растворителей типа  $B$ . Увеличение числа

компонентов  $B$  свыше  $n-1$  положительного влияния на разделение не оказывает.

Таким образом, необходимость использования, например, трехкомпонентного элюента может возникнуть лишь при анализе трехкомпонентных и более сложных смесей.

### 4.1.2. Растворители

**Физические и химические свойства.** Современный хроматограф — сложный комплекс механических, оптических, электрических и химических узлов и его надежная работа во многом зависит от свойств и качества используемых растворителей.

Наличие в подвижной фазе механических примесей в первую очередь отрицательно сказывается на работе насоса, вызывая нечеткую работу клапанов, способствуя износу плунжеров и уплотнений. Кроме того, твердые частицы, накапливаясь на фильтре у входа в колонку, приводят к постепенному увеличению ее сопротивления, невоспроизводимости рабочего давления либо времени удерживания при использовании насосов постоянного расхода и постоянного давления, соответственно. Поэтому перед использованием подвижная фаза должна быть профильтрована через материал с размером пор около 0,5 мкм. Как правило, повторная фильтрация осуществляется уже в хроматографе, при отборе растворителя из резервуара.

Надежная работа насоса также сильно зависит от летучести используемых растворителей. При резком всасывании в камере насоса даже предварительно дегазированные растворители иногда образуют паровые пузыри, препятствующие работе клапанов. Этот эффект наиболее выражен у таких летучих растворителей, как пентан, ацетон, метиленхлорид и диэтиловый эфир. Кроме того, подвижные фазы, содержащие эти вещества, могут изменить свой состав в ходе работы из-за испарения, что приводит к невоспроизводимости величин удерживания. Поэтому следует избегать использования растворителей, кипящих при температуре ниже 60 °С. С другой стороны, для менее летучих растворителей характерна более высокая вязкость, что отрицательно сказывается на эффективности разделения и вынуждает использовать большие давления для достижения желаемой скорости разделения. Предельно допустимая вязкость подвижной фазы зависит от размера частиц сорбента и качества упаковки колонки. В качестве ориентира можно указать величину 1,5 сП. При такой вязкости и линейной скорости подвижной фазы около 0,4 см/с давление на выходе качественной колонки не должно превышать 200 атм. Если все же обстоятельства вынуждают пользоваться более вязкими подвижными фазами, колонку следует термостатировать при повышенной температуре, например около 60 °С.

Определенные требования к растворителям предъявляются

в зависимости от метода детектирования. Ясно, что при применении детекторов, основанных на поглощении света, подвижная фаза должна быть прозрачна в избранной спектральной области. Набор растворителей, прозрачных для УФ-света вплоть до 190—220 нм, довольно велик. Однако в каждом конкретном случае этот показатель определяется не столько физическими свойствами основного вещества, сколько содержанием УФ-поглощающих примесей. Обычно содержание таких примесей не нормируется даже для растворителей квалификации «химически чистый». Поэтому рекомендуется применять растворители специальных квалификаций — «для жидкостной хроматографии» или «для спектроскопии». При отсутствии готовых растворителей необходимого качества их можно очистить в лаборатории методами, описанными в работах [75, 76]. Чувствительность рефрактометрического детектора зависит от разности коэффициентов преломления подвижной фазы и анализируемых соединений. Поэтому для большинства случаев можно рекомендовать подвижные фазы, имеющие минимальные величины коэффициентов преломления. Характеристики растворителей, наиболее важные с хроматографической точки зрения, приведены в табл. III.12.

Таблица III.12. Свойства растворителей

Растворитель	Температура кипения, °C	Плотность, $d_{20}$	Вязкость при 25 °C СП	Коэффициент преломления, $n_D^{20}$
Ацетонитрил	82	0,78	0,34	1,341
Бензол	80	0,88	0,60	1,498
Вода	100	1,00	0,89	1,333
Гексан	69	0,66	0,30	1,372
Гептан	98	0,68	0,40	1,385
Диметилформамид	153	0,94	0,80	1,428
Диоксан	101	1,03	1,2	1,420
Дихлорэтан	83	1,25	0,78	1,442
Диэтиловый эфир	35	0,71	0,24	1,350
Изооктан	99	0,69	0,47	1,389
Метанол	65	0,79	0,54	1,326
Метиленхлорид	40	1,33	—	1,421
Метилэтилкетон	80	0,86	0,38	1,376
Пентан	36	0,63	0,22	1,355
Пропанол-1	97	0,80	1,9	1,385
Пропанол-2	82	0,79	1,9	1,384
Тетрагидрофуран	66	0,89	0,46	1,405
Тетрахлорид углерода	77	1,60	0,90	1,457
Толуол	110	0,87	0,55	1,494
Триэтиламин	89	0,73	0,36	1,398
Уксусная кислота	118	1,05	1,1	1,370
Хлороформ	61	1,49	0,53	1,443
Циклогексан	81	0,78	0,90	1,423
Этанол	78	0,79	1,08	1,359
Этилацетат	77	0,90	0,43	1,370

\* Ориентировочная оценка



Остановимся кратко на нескольких, наиболее часто применяемых растворителях.

Вода является базовым растворителем в обращенно-фазовой и ионообменной хроматографии. Обычная дистиллированная вода после надлежащего фильтрования может быть использована преимущественно в тех работах, где не требуется достижения максимальной чувствительности. Она может оказаться недостаточно очищенной для более тонких работ, в особенности с применением градиентного элюирования. В последнем случае имеющиеся в ней примеси могут при регенерации колонки накапливаться в ней, а при повышении в ходе разделения элюирующей силы выходить из колонки в виде ложных пиков. Поэтому желательна помимо дистилляции дополнительная очистка воды в специальных фильтрующих системах (например, фирмы «Миллипор»), удаляющая остаточные ионы и органические примеси.

Спирты (метанол, этанол, изопропиловый спирт) достаточно высоких квалификаций, имеющиеся в продаже, как правило, могут использоваться без дополнительной очистки. Для обращенно-фазовой хроматографии следует предпочесть метанол как наименее вязкий, для нормально-фазовых разделений — изопро-

для ВЭЖХ

Предел прозрачности для УФ-света, нм	Элюирующая сила, $\epsilon^0$ на силикагеле	Параметр $R'$	Параметр $S$	Группа селективности
190	0,50	5,8	3,1	VI
280	0,10*	2,7	—	VII
—	1,50*	10,2	0,0	VIII
190	0,01	0,1	—	—
195	0,01	0,2	—	—
268	1,00*	6,4	—	III
215	0,45*	4,8	3,5	VI
228	0,20*	3,5	—	V
218	0,30*	2,8	—	I
197	0,01	0,1	—	—
205	0,7	5,1	3,0	II
233	0,32	3,1	—	V
329	0,40*	4,7	—	VI
195	0,01	0,0	—	—
240	0,55*	4,0	—	II
205	0,55*	3,9	4,2	II
212	0,44	4,0	4,4	III
265	0,1*	1,6	—	—
285	0,10*	2,4	—	VII
—	—	1,9	—	I
—	—	6,0	—	VI
245	0,26	4,1	—	VIII
200	0,02*	—0,2	—	—
210	0,60*	4,3	3,6	II
256	0,38	4,4	—	VI

пиловый спирт, неограниченно смешивающийся с углеводородами.

Ацетонитрил очень удобен для обращенно-фазовой хроматографии, сочетает низкую вязкость и хорошую растворяющую способность. Продажный ацетонитрил, не предназначенный специально для жидкостной хроматографии, как правило, содержит примеси, затрудняющие работу с УФ-детектором при малых длинах волн. Простой способ очистки, дающий растворитель, пригодный для большинства целей, заключается в следующем. Один объем ацетонитрила смешивают с одним объемом воды и трижды экстрагируют гексаном порциями по 0,2 объема. Гексановые экстракты отбрасывают, водно-ацетонитрильную фазу перегоняют с дефлегматором. При 75—77 °С отгоняется азеотропная смесь ацетонитрил — вода, содержащая около 84% ацетонитрила. Концентрацию ацетонитрила можно уточнить (например, методом ГЖХ) после чего полученную смесь используют для приготовления подвижных фаз. Спектрофотометрические измерения показывают, что основная часть УФ-поглощающих примесей отделяется на стадии экстракции. Дополнительные количества примесей отгоняются в виде азеотропных смесей с водой при 70—75 °С.

Эфиры (диэтиловый, диоксан, тетрагидрофуран) широко применяют в нормально-фазовой хроматографии. При этом необходимы соответствующие предосторожности, поскольку эфиры склонны к образованию пероксидов, что отрицательно влияет на прозрачность в УФ-свете.

Галогенуглеводороды (из растворителей этой группы наиболее популярен хлороформ) используют в нормально-фазовой хроматографии. Качество фармакопейного хлороформа обычно удовлетворяет основным требованиям. Следует, однако, помнить, что продажный хлороформ содержит около 1% стабилизатора — этанола. Желательно также проводить контроль рН водной вытяжки этих растворителей, так как примеси хлороводорода способствуют коррозии аппаратуры.

Ароматические углеводороды обладают хорошей растворяющей способностью, но их используют редко из-за токсичности паров и непрозрачности по отношению к УФ-свету.

Алканы оптимальны для хроматографии малополярных веществ. Из веществ этой группы наиболее подходящим растворителем, достаточно мало летучим и невязким, является гексан. По отношению к полярным веществам они обладают недостаточной растворяющей способностью, даже будучи смешаны с более полярными растворителями.

**Классификация.** Целью классификации растворителей с точки зрения их хроматографических свойств является создание стройной системы, позволяющей оценивать их силу и селективность, осуществлять целенаправленный выбор состава подвижных фаз. Элюотропные ряды являются простейшей формой оценки силы

индивидуальных растворителей. Они дают количественную оценку адсорбционной способности растворителей в тех или иных режимах хроматографического разделения. Элюотропный ряд — это перечень растворителей, расположенных в порядке возрастания элюирующей способности, которая может быть охарактеризована различными параметрами. Так, параметр адсорбционной силы растворителя  $\epsilon^0$  [77] с физической точки зрения представляет собой относительную энергию взаимодействия молекул подвижной фазы с поверхностью адсорбента. Этот параметр предложен для адсорбционной хроматографии, и его численные значения для разных неподвижных фаз, естественно, различны. Обычно на полярных неподвижных фазах сила растворителя увеличивается по мере роста его полярности, а для неполярных неподвижных фаз наблюдается обратная последовательность. Это подтверждают данные табл. III.13, в которой сопоставлены значения  $\epsilon^0$  некоторых растворителей на силикагеле, оксиде алюминия и модифицированной саже. Одновременно видим также, что некоторые растворители отличаются специфическим характером. Так, изопропиловый эфир проявляет сравнительно слабую элюирующую силу на оксиде алюминия, а хлороформ является на этом сорбенте относительно сильным элюентом. Гексан, который менее полярен, чем хлороформ, вопреки простейшей логике является более слабым растворителем по отношению к неполярному сорбенту — модифицированной саже.

Параметр  $\epsilon^0$  является первой отправной точкой при выборе состава неподвижной фазы для адсорбционной хроматографии. Все же нельзя не отметить, что фактическое поведение сложных полифункциональных сорбатов может заметно отличаться от ожидаемого на основании величин  $\epsilon^0$ . Это происходит потому, что  $\epsilon^0$  может зависеть от вида соединений, по которым он экспериментально определен.  $\epsilon^0$  как параметр силы растворителя все же всегда несет на себе печать селективности.

На основании данных Роршнайдера о растворимости паров, Снайдер [78, 79] предложил параметр  $P'$  (см. табл. III.13), который может служить мерой элюирующей силы в распределительной хроматографии [80]. Параметр  $P'$  рассчитывают как сумму логарифмов коэффициентов распределения ряда стандартных веществ между паровой фазой и испытуемым растворителем.

Для обращенно-фазовой хроматографии предложен в качестве критерия элюирующей силы параметр  $S$  [79] (см. табл. III.12), отражающий чувствительность величин удерживания к изменению состава подвижной фазы.

Сравнение различных способов оценки элюирующей силы показывает, что они сходным образом демонстрируют лишь общие тенденции. На практике всегда следует иметь в виду, что возможны заметные отклонения реального поведения сорбатов от ожидаемого, исходя из тех или иных критериев элюирующей

Таблица III.13. Элюирующая сила растворителей на различных сорбентах

Растворитель	Силикагель*	Оксид алюминия*	Сажа
Гексан	0,01	0,01	0,10
Бензол	—	0,32	0,20
Бутилхлорид	0,20	0,26	0,13
Хлороформ	0,26	0,40	0,18
Метиленхлорид	0,32	0,42	0,13
Изопропиловый эфир	0,34	0,28	—
Этилацетат	0,38	0,58	0,13
Тетрагидрофуран	0,44	0,57	0,14
Ацетонитрил	0,50	0,65	0,04
Метанол	0,7	0,95	0,00

\* [5], с. 366.

силы. Правильный выбор элюирующей силы подвижной фазы является необходимым, но не всегда достаточным условием успешного разделения. Для целенаправленного выбора или изменения состава подвижной фазы необходимо ввести рациональную классификацию растворителей по их селективности, подобно тому, как это было сделано в отношении элюирующей силы. Основой всех способов классификации селективности является различная способность растворителей вступать в межмолекулярные взаимодействия различных типов, представление интегрального параметра элюирующей силы в виде суммы парциальных величин, характеризующих донорные, акцепторные, диполь-дипольные и другие свойства. Отослав заинтересованного читателя к первоисточникам [81—84], остановимся лишь на изображении свойств растворителей в виде треугольника селективности [85]. Вершинам его (рис. III.32) отвечают гипотетические растворители, способные к межмолекулярным взаимодействиям только одного типа. Окружности в его пределах изображают области, соответствующие реально существующим растворителям группы Б, подразделенные на восемь подгрупп селективности: I — алифатические простые эфиры, амины; II — алифатические

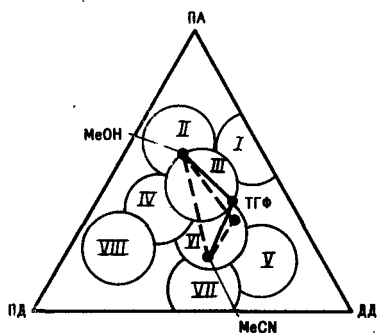


Рис. III.32. Треугольник селективности. Вершины соответствуют гипотетические растворители, способные только к протонодонорным (ПД), протонакцепторным (ПА) и диполь-дипольным (ДД) взаимодействиям. Пунктиром обозначена область селективности, доступная в обращенно-фазовом режиме

спирты; III — пиридины, тетрагидрофуран, амиды (кроме форм-амиды), эфиры гликолей, сульфоксиды; IV — гликоли, уксусная кислота, формамид; V — метилхлорид, этиленхлорид; VI — алифатические кетоны и сложные эфиры, диоксан, сульфоны, нитрилы; VII — ароматические углеводороды, нитросоединения; VIII — фторированные спирты, вода, хлороформ.

Этот наглядный подход позволяет качественно предвидеть, насколько вероятно изменение селективности при замене одного растворителя *Б* на другой. А именно: растворители, принадлежащие к одной группе, сходны по своей селективности, максимальных различий селективности можно ожидать от растворителей, наиболее удаленных друг от друга на треугольнике.

#### 4.1.3. Специфические модификаторы

Рассмотренный выше принцип подбора состава подвижных фаз на основе смесей растворителей, резко различающихся по элюирующей силе, применим лишь в простейших случаях, когда отсутствуют затруднения, связанные с особым химическим характером разделяемых веществ. При изучении высокополярных и ионогенных соединений зачастую не удается найти удовлетворительного решения с помощью этого способа. Иногда при их разделении образуются асимметричные аномально уширенные хроматографические зоны. В других случаях вообще не удается добиться элюирования, либо наоборот — времена удерживания слишком малы. Можно назвать некоторые типичные причины таких осложнений: в системе одновременно осуществляется сорбция по нескольким разным механизмам; изотерма сорбции нелинейна; молекулы сорбата или сорбента находятся в форме, препятствующей реализации требуемого механизма сорбции.

Но даже при удовлетворительной симметрии пиков может возникнуть необходимость радикального изменения механизма разделения на данном сорбенте, чтобы достичь требуемой селективности разделения определенных компонентов.

Устранить ряд нежелательных явлений, а также изменить в нужном направлении свойства сорбента редко удается с помощью обычных химически нейтральных растворителей. Этого достигают добавкой специфических модификаторов. Специфическими модификаторами будем называть добавки, вводимые в подвижную фазу в небольших количествах (0,01—2%) с целью изменения термодинамических характеристик системы. Действие модификаторов может быть связано с различными физико-химическими процессами. Например, они могут блокировать сорбционно наиболее активные центры неподвижной фазы, повышая тем самым ее химическую однородность. Модификатор может использоваться для подавления ионизации сорбата, что в обращенно-фазовой хроматографии приводит к улучшению формы пика. Введение

специфического модификатора направляет сорбцию по наиболее выгодному в данном случае механизму. Наиболее распространенные модификаторы водных и водно-органических подвижных фаз — соли, кислоты, основания, придающие элюенту желаемую ионную силу и рН. Подвижные фазы на основе органических растворителей модифицируют чаще всего органическими кислотами и основаниями.

Рассмотрим наиболее широко используемые вещества этой группы.

Уксусную кислоту применяют в концентрации 0,5—2% в нормально-фазовой хроматографии карбоновых кислот. В обращенно-фазовой хроматографии используют для приготовления аммоний-ацетатных буферных растворов, реже — в индивидуальном виде для создания необходимого рН. Растворы, содержащие уксусную кислоту и ацетаты, не позволяют работать с УФ-детекторами в области ниже 230 нм.

Фосфорную кислоту используют в обращенно-фазовой хроматографии для приготовления буферных растворов, реже — в виде индивидуальной добавки (0,1—1%) для создания кислой среды. Подвижные фазы, содержащие фосфат-ионы, прозрачны в области до 200 нм.

Аммиак (водные растворы) применяют при приготовлении буферов для обращенно-фазовой и ионообменной хроматографии. Изредка используют как индивидуальную добавку с целью улучшения формы пиков веществ основного характера. В таких случаях следует проявлять осторожность, поскольку при рН 8 возможно быстрое разрушение сорбентов на основе силикагеля.

Алифатические амины используют, как и аммиак, в нормально-фазовой хроматографии. Они могут заметно влиять на селективность разделения, так как снижают полярность поверхности сорбента. Применяются также для маскировки остаточных силанольных групп в модифицированных силикагелях. В присутствии таких добавок улучшается воспроизводимость результатов, получаемых на разных партиях и марках сорбентов.

Диметилформамид (0,1—0,5%), добавленный в подвижную фазу, благотворно влияет на форму пиков в нормально-фазовой хроматографии.

Алкилсульфаты натрия (алкил от  $C_2$  до  $C_{12}$ ), добавленные в подвижные фазы в количестве 0,001—0,01 моль/л, при рН 2—5 переводят обычную обращенно-фазовую хроматографию в так называемый ион-парный режим. При этом величина удерживания оснований возрастает, иногда очень значительно, а форма их пиков улучшается.

Соли тетраалкиламмония, чаще всего в концентрациях 0,001—0,01 моль/л (фосфат тетрабутиламмония и бромид цетилтриметиламмония) переводят при рН 3—7 процесс в ион-парный режим, оказывают на хроматографическое поведение кислот такое же действие, как алкилсульфонаты на удерживание оснований.

## 4.2. ВЫБОР УСЛОВИЙ РАЗДЕЛЕНИЯ

### 4.2.1. Структурные и композиционные факторы, влияющие на хроматографическое удерживание

Распределение молекул сорбатов между неподвижной и подвижной фазами определяется в первую очередь сравнительным сродством этих молекул к полярным и неполярным растворителям (или поверхностям). Это сродство является главным фактором, влияющим на величины удерживания, выбор неподвижных и подвижных фаз. Так, при использовании неполярных неподвижных фаз удерживание ряда сорбатов уменьшается с увеличением их полярности, а удерживание данного сорбата на данной неподвижной фазе уменьшается с уменьшением полярности подвижной фазы, т. е. при добавлении к воде органических растворителей. В противоположность этому при хроматографии на полярных сорбентах удерживание растет с ростом полярности сорбатов и уменьшением полярности подвижной фазы.

Сродство к подвижной и неподвижной фазам определяется, разумеется, не только полярностью сорбатов, тем более, что применительно к хроматографическим процессам само понятие «полярность» не вполне однозначно. Влияние на сродство оказывают и такие факторы, как пространственное строение сорбатов, характер распределения электронной плотности в их молекулах, кислотно-основные свойства, внутримолекулярные взаимодействия.

Рациональные приемы выбора условий разделения основываются на закономерностях, связывающих величины удерживания со строением разделяемых веществ (структурными факторами) и составом фаз хроматографической системы (композиционными факторами). Влияние строения сорбатов обычно анализируют на основе различных модификаций аддитивных схем, исходящих из того, что вклад структурных фрагментов в величину  $\lg k'$  является более или менее постоянной величиной, не зависящей от строения остальной части молекулы. Так, введение в молекулу органического соединения дополнительной метиленовой группы приводит к увеличению сродства к неполярным средам. Следовательно, при этом возрастают коэффициенты емкости на алкилсиликагелях. При постоянных условиях хроматографирования в гомологических рядах наблюдается линейная зависимость  $k'$  от числа атомов углерода. Удерживание в зависимости от условий разделения возрастает в 1,3—2,2 раза на каждую метиленовую группу. В случае хроматографии на силикагелях увеличение углеродного скелета приводит к увеличению сродства к подвижной фазе и, следовательно, уменьшению удерживания. Этот эффект, однако, выражен не столь явно и не отличается таким постоянством, как при обращенно-фазовой хроматографии. Величины

удерживания уменьшаются в 1,1—1,3 раза на каждую метиловую группу.

Введение в молекулы сорбатов дополнительных полярных групп вызывает увеличение удерживания на силикагеле (в 2—6 раз на одну группу в зависимости от ее полярности и условий разделения) и уменьшение — на алкилсиликагелях (в 1,5—3 раза).

Влияние композиционных факторов на удерживание может быть в общих чертах выражено рядом правил.

Адсорбционная либо распределительная хроматографическая система обладает удерживающей способностью только в тех случаях, когда условная полярность подвижной и неподвижной фаз различается в достаточной степени. Величины удерживания тем больше, чем больше разница в полярности, химической природе фаз.

Приемлемые величины удерживания достижимы только в таких системах, в которых полярность сорбата является промежуточной по сравнению с полярностью подвижной и неподвижной фаз. Поэтому основной способ влияния на удерживание на данном сорбенте — изменение полярности подвижной фазы.

При хроматографии на силикагеле часто соблюдается следующее правило: удваивание концентрации полярного компонента в подвижной фазе ведет к уменьшению удерживания в 2—2,5 раза. Зависимость логарифма коэффициента емкости от логарифма молярной концентрации полярного компонента обычно линейна. При хроматографии на алкилсиликагелях такая зависимость еще более характерна, однако коэффициенты влияния на емкость для разных сорбатов различны и возрастают с ростом их гидрофобности. В качестве первых ориентиров можно использовать следующие данные: уменьшение концентрации органического растворителя в подвижной фазе в 1,2 раза приводит к 2—2,5-кратному уменьшению удерживания сильносорбирующихся веществ ( $k' > 10$ ) и 1,2—1,5-кратному уменьшению для слабосорбирующихся ( $k' < 2$ ).

Определенные проблемы возникают при хроматографии ионных соединений. В случае, если рН среды такое, что допускается одновременное существование сорбата в нейтральной и ионизированной формах, степень ионизации в сорбированном и десорбированном состоянии различна. Следствием является снижение эффективности разделения, нарушение симметрии пика. Поэтому при обращенно-фазовой хроматографии таких веществ почти всегда пользуются подвижными фазами на основе буферных растворов. Без этого трудно добиться не только качественного разделения, но и воспроизводимости результатов. Общим правилом (хотя количественное проявление этого эффекта для разных сорбатов различно) является уменьшение удерживания оснований и увеличение удерживания кислот с понижением рН подвижной фазы.



### 4.2.2. Выбор типа хроматографической системы

Под термином «тип хроматографической системы» понимают сочетание определенных признаков качественного состава: сорбента того или иного химического класса, подвижной фазы на основе водных или органических растворителей характеризующейся интервалом pH, наличием специфических добавок кислого, основного или поверхностно-активного характера и т. д. Выбор типа системы основывается в первую очередь на оценке полярности и кислотно-основных свойств компонентов изучаемой смеси. Условная оценка полярности анализируемых веществ, понимаемой в данном случае как относительное количество полярных и неполярных структурных фрагментов, представленных в их молекулах, может быть основана на шкале упрощенного критерия гидрофобности  $H$ . Этот критерий рассчитывается по формуле:

$$H = n_H - 4\sqrt{n_f},$$

где  $n_H$  — суммарное число атомов углерода и галогенов;  $n_f$  — число функциональных групп в молекуле сорбата.

Показано, что критерий  $H$  коррелирован с более строгими (и сложными в расчете) параметрами гидрофобности, удовлетворительно учитывает как преимущественно аддитивное влияние неполярных фрагментов ( $6 < n_H < 25$ ), так и неаддитивное влияние полярных ( $6 > n_f > 1$ ).

Сопоставление структуры, опосредованной с помощью критерия  $H$ , и условий анализа свыше 2000 соединений позволяет предложить рациональную схему выбора типа хроматографической системы, представленную на рис. III.33—III.35.

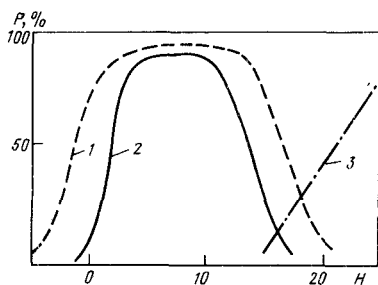


Рис. III.33. Условная вероятность применимости различных типов хроматографических систем для неионогенных сорбатов различной полярности:

1 — сорбент — алкилсиликагель, подвижная фаза — вода — метанол, вода — ацетонитрил, 2 — сорбент — силикагель, подвижная фаза — бинарные или более сложные смеси органических растворителей различной полярности; 3 — сорбент — алкилсиликагель, подвижная фаза — метанол либо ацетонитрил с добавками хлороформа либо метилхлорида

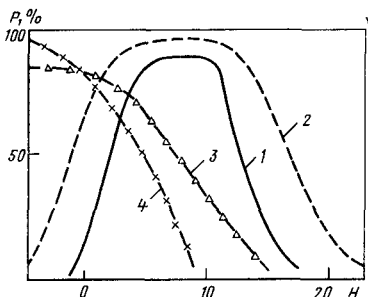


Рис. III.34. Условная вероятность применимости различных типов хроматографических систем для сорбатов, обладающих кислотными свойствами и различной полярностью:

1 — сорбент — силикагель, подвижная фаза — смесь органических растворителей с добавкой уксусной кислоты (0,5—1%); 2 — сорбент — алкилсиликагель, подвижная фаза — вода или метанол в смеси с буферным раствором, pH 2—3; 3 — сорбент тот же, pH 5—7, с добавками нон-парного агента, 4 — сорбент — анионит, подвижная фаза — буферные растворы

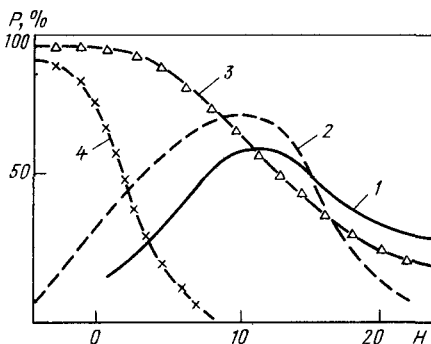


Рис. III 35 Условная вероятность применимости различных типов хроматографических систем для оснований различной полярности:

1 — сорбент — силикагель, подвижная фаза — смеси органических растворителей с добавками низших аминов или диметилформамида (0,5—1%), 2 — сорбент — алкилсиликагель, подвижная фаза — вода или метанол в смеси с буферным раствором pH 2—7, 3 — сорбент тот же, подвижная фаза та же, pH 2—4, добавки ион парного агента (0,001—0,01 моль/л), 4 — сорбент — катионит, подвижная фаза — буферный раствор

В силу разнообразия взаимного влияния структурных фрагментов в молекулах сорбатов, условности самого термина «тип хроматографической системы», а также присутствия в реальных анализируемых смесях компонентов различной химической природы, предлагаемые рекомендации носят ориентировочный характер, не являются универсальным готовым рецептом решения хроматографических проблем, а служат выбору кратчайших путей к достижению желаемого результата.

При хроматографии неионогенных сорбатов средней полярности очень часто оказываются пригодными как нормально-, так и обращенно-фазовые системы. Преимущества последних выявляются наиболее отчетливо для сорбатов, обладающих либо низкой, либо высокой полярностью.

При попытке хроматографировать малополярные вещества на силикагеле обычно обнаруживают, что желаемые значения  $k'$  достигаются только при крайне низких концентрациях полярного растворителя в подвижной фазе. В подвижных фазах такого рода на силикагеле заметно увеличивается продолжительность приведения системы в равновесие, нередко неудовлетворительна устойчивость величин удерживания. Для особополярных веществ на силикагеле часто бывает характерна асимметрия хроматографических зон, зависимость удерживания от массы пробы, необратимая сорбция. Все это затрудняет аналитическое использование метода. Для сорбатов средней полярности обращенно-фазовая хроматография и хроматография на силикагеле примерно с одинаковой вероятностью приводят к удовлетворительному результату. Однако здесь при выборе одного или другого режима следует, исходя из реальной аналитической задачи,

учитывать разный характер селективности рассматриваемых сорбентов. Так, силикагель обычно значительно селективнее при разделении изомеров, а также сорбатов, различающихся по функциональности. С другой стороны, при разделении гомологов большей селективностью обладают алкилсиликагели. Если же в анализируемой смеси предполагаются компоненты разной химической природы, начать разработку метода лучше с обращенно-фазового сорбента.

При хроматографии кислот на силикагеле нередко наблюдается асимметрия пиков, связанная с энергетической неоднородностью поверхности сорбента. Поэтому в подвижную фазу следует добавлять 0,5—2% уксусной кислоты, блокирующей центры, способные к специфической ассоциации с карбоксильными группами. В водно-органических подвижных фазах, характерных для обращенно-фазовой хроматографии, карбоновые кислоты могут существовать как в нейтральной, так и в ионизированной формах, причем соотношение этих форм в подвижной и неподвижной фазах различно. В результате пики кислот зачастую асимметричны, а величины удерживания недостаточно стабильны. Указанные осложнения легко преодолеваются, если с помощью буферного раствора или добавки кислоты поддерживать рН подвижной фазы 2—3. Такой режим иногда называют «режимом подавления ионизации». Однако наиболее гидрофильные кислоты и в этом режиме характеризуются малыми величинами удерживания, непригодными для аналитических работ. Для таких сорбатов можно рекомендовать ионообменную либо ион-парную хроматографию. В последнем случае в качестве неподвижных фаз используют те же алкилсиликагели, а подвижная фаза помимо буферного раствора (рН 5—7) содержит гидрофобный противоион (чаще всего тетрабутиламмоний или цетилтриметиламмоний) в концентрации 0,001—0,01 моль/л. Добавка такого ион-парного агента приводит к относительному возрастанию удерживания кислот и может, помимо обеспечения необходимого удерживания, служить также средством изменения селективности процесса.

Еще труднее преодолеть проблемы при анализе оснований. Остаточные силанольные группы сорбента, обладающие кислотными свойствами, могут при определенных условиях взаимодействовать с сорбатами по ионообменному механизму, что отрицательно сказывается на форме пиков и устойчивости величин удерживания. При нормально-фазовой хроматографии оснований в органическую подвижную фазу можно добавить 0,5—1% основания, например диметилформамида. Однако в данном случае этот подход не столь эффективен, как добавление уксусной кислоты при хроматографии кислот. При обращенно-фазовой хроматографии оснований на алкилсиликагелях метод подавления ионизации неприменим, так как модифицированные силикагели неустойчивы при  $\text{pH} > 7,5$ . При использовании кислых буферных растворов

достигается фиксация отношения протонированной и нейтральной форм основания. Появляется возможность хроматографировать многие вещества этой группы в обращенно-фазовом режиме. Для гидрофильных оснований во многих случаях подходит хроматография на катионитах. Однако наиболее общим приемом является ион-парная хроматография на алкилсиликагелях в водно-органических растворителях, содержащих 0,001—0,01 моль/л гидрофобного противоиона (гексил- или додецилсульфата). Такой режим обеспечивает приемлемое удерживание даже очень гидрофильных оснований, удовлетворительную форму пиков, позволяет по желанию варьировать селективность разделения за счет изменения концентрации ион-парного агента.

#### 4.2.3. Выбор элюирующей силы и селективности подвижной фазы

В подавляющем большинстве случаев подвижная фаза состоит из двух или более компонентов. При этом один компонент подвижной фазы в системе данного типа является сорбционно неактивным, т. е. сам по себе не в состоянии вызвать элюирование введенных в колонку анализируемых веществ (растворители *A*). Среди остальных компонентов подвижной фазы, помимо веществ специального назначения (соли буферов, ион-парные и другие модификаторы), присутствует растворитель сорбционно активный, который сам по себе способен приводить к быстрому элюированию компонентов пробы (растворители *B*). Задача выбора элюирующей силы, приемлемой для данного сорбата, сводится к определению такого соотношения компонентов *A* и *B*, которое обеспечивает необходимые для данной задачи величины удерживания. В зависимости от типа хроматографической системы и характера сорбатов одно и то же соединение может выступать в качестве растворителя *A* или *B*. Так, при анализе малополярных сорбатов на силикагеле может оказаться полезной система растворителей гексан — хлороформ. В этом случае хлороформ выступает в роли растворителя *B*, т. е. увеличение его концентрации вызывает уменьшение удерживания. При хроматографии на этом же сорбенте более полярных сорбатов часто используют систему растворителей хлороформ — метанол. Однако здесь компонентом *B*, определяющим подвижность зоны, является метанол, в то время как хлороформ выступает в роли компонента *A*, т. е. инертного разбавителя подвижной фазы.

**Хроматография на алкилсиликагелях.** Выбор элюирующей силы в рамках данного типа хроматографической системы сводится к выбору концентрации органического компонента подвижной фазы. В зависимости от объема исходной информации об изучаемой смеси рациональными являются различные подходы к решению этой задачи.

В наиболее сложном случае, когда происхождение и диапазон

полярности компонентов изучаемой смеси неизвестны, целесообразно провести пробное разделение в условиях градиентного элюирования.

Положение пиков, зарегистрированных при увеличении концентрации органического растворителя от 0 до 100%, позволит судить о диапазоне полярности и выбрать, если возможно, изократический режим.

В случае, когда известна структура анализируемых компонентов, но аналитик не располагает моделями удерживания веществ данного класса, может быть использован подход, основанный на зависимости величин удерживания от упрощенного критерия гидрофобности. Для оценки этой зависимости мы обобщили опубликованные в литературе режимы обращенно-фазовых разделений свыше 400 лекарственных веществ. Несмотря на то что эти анализы выполнялись на различных обращенно-фазовых сорбентах, в разных буферных растворах, усредненные характеристики, представленные на рис. III.36, показывают наличие связи между структурой сорбата и той концентрацией органического растворителя, которая необходима для обеспечения приемлемого удерживания, чтобы уже в первом эксперименте достоверно наблюдать пик интересующего соединения. Конечно, закономерность, изображенная на рис. III.36, является грубо приближенной, и поэтому коэффициент емкости, полученный в найденных условиях, может заметно отличаться от оптимального для данной аналитической ситуации. Оптимизация концентрации органического растворителя может быть далее выполнена на основании эмпирической модели:

$$\lg C_x = 1,4 - (1,4 - \lg C) (\lg k'_x + 0,7) / (\lg k' + 0,7),$$

где  $k'$  — коэффициент емкости, измеренный при концентрации органического растворителя  $C$ , моль/л;  $C_x$  — концентрация органического растворителя, необходимая для получения желаемого значения  $k'_x$ .

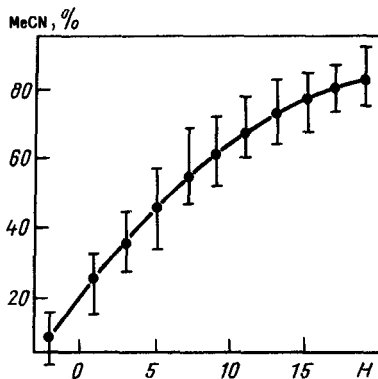


Рис. III.36. Зависимость средней концентрации органического растворителя в подвижных фазах обращенно-фазовой хроматографии от упрощенного критерия гидрофобности сорбата  $H$

В условиях, найденных по рис. III.36, обычно получаются коэффициенты емкости в пределах 0,6—1,4. Эти значения следует признать в общем случае слишком малыми для использования в аналитической практике. Однако пробные хроматограммы, выполненные в таких режимах, обладают и преимуществом: они позволяют оценить состав изучаемого образца в более широком диапазоне гидрофобности. Оптимизация, выполненная с помощью приведенного выше уравнения, приводит к значениям  $k'$ , оптимальным для аналитического применения и не слишком сильно отличающимся от заданных.

Прогнозирование удерживания и выбор состава подвижных фаз, естественно, осуществимы с большей надежностью, если известна принадлежность сорбата к определенному классу веществ и модель удерживания этого класса на конкретном обращенно-фазовом сорбенте. Опыт показывает, что для получения такой модели часто достаточно детально изучить поведение 10—20 соединений рассматриваемого класса. Затраты времени на такое предварительное исследование вполне оправдывают себя, если предстоит выполнение обширных аналитических программ, анализ многих ранее не изучавшихся хроматографическим методом соединений.

**Нормально-фазовая хроматография на силикагеле.** Взаимосвязь между строением сорбатов и их величинами удерживания в этом режиме хроматографии весьма сложна, что не дает пока возможности создать универсальную, хотя бы и весьма приближенную, модель удерживания. Поэтому первоначальный выбор элюирующей силы подвижной фазы в значительной степени зависит от интуиции и опыта хроматографиста, от того, насколько хорошо изучен данный класс веществ. При наличии достаточной информации для прогнозирования состава подвижной фазы может быть использован метод сравнительных расчетов. Он позволяет оценить, медленнее или быстрее будет элюироваться данное вещество, чем соединение, принятое в качестве прототипа. Однако часто даже и столь ограниченная модель отсутствует, и в выборе элюирующей силы для первого, пробного разделения остается руководствоваться эмпирическими правилами. При этом целью такого пробного разделения является не столько получение хроматограммы, непосредственно пригодной для анализа, сколько общая оценка подвижности компонентов и получение исходной информации для оптимизации элюирующей силы.

Пользуясь шкалой параметра  $H$ , можно условно разделить множество соединений, поддающихся анализу на силикагеле, на три группы. К наименее полярным отнесем вещества с  $15 > H > 10$ . Для веществ этой группы можно рекомендовать пробное разделение в смеси гексан — изопропиловый спирт (95 : 5) или в смеси гексан — хлороформ (1 : 1). Первую попытку хроматографирования среднеполярных веществ ( $10 > H > 5$ ) можно выполнить

с подвижными фазами гексан — изопропиловый спирт (80 : 20), либо хлороформ — метанол (95 : 5). Наконец, для веществ с  $5 > H > 0$  часто подходящим оказывается состав хлороформ — метанол (80 : 20). В качестве компонента *A*, как видим, используют гексан либо хлороформ. Выбор одного из этих двух растворителей определяется растворимостью компонентов пробы и длиной волны УФ-детектора (ниже 245 нм хлороформ непригоден). Полярные растворители, предложенные здесь, могут, разумеется, быть заменены другими, в соответствующих концентрациях. В результате пробного разделения в одном из приведенных режимов с высокой степенью вероятности будет получена хроматограмма с  $1 > k' > 0$ . Дальнейшая оптимизация элюирующей силы выполняется на основании упомянутого выше правила об удвоении значений  $k'$  при двукратном уменьшении концентрации растворителя *B*.

При хроматографии не слишком сложных смесей (до 4—6 компонентов) на высокоэффективных колонках выбор состава подвижной фазы очень часто заканчивается уже на стадии оптимизации элюирующей силы. Однако, если число определяемых веществ велико, нарастает вероятность того, что, несмотря на оптимальную элюирующую силу, пики отдельных соединений окажутся неразделенными. В этой ситуации возникает необходимость оптимизации селективности, т. е. поиска таких компонентов *B*, которые в большей степени пригодны для разделения данной смеси. Теоретические основы селективности хроматографических систем по отношению к основным функциональным группам органических соединений пока совершенно не разработаны и прогресс здесь, по-видимому, является перспективой отдаленного будущего. В настоящее время прогнозирование изменений селективности вследствие изменения качественного состава подвижной фазы может быть основано на ряде чисто качественных правил: в режиме обращенно-фазовой хроматографии селективность разделения всех веществ, как правило, несколько возрастает с уменьшением элюирующей силы; селективность системы по отношению к соединениям, различающимся структурными фрагментами, можно изменить, изменяя концентрации того компонента подвижной фазы, который в наибольшей степени способен к межмолекулярным взаимодействиям с одним из этих структурных фрагментов; при хроматографии на силикагеле селективность повышается, если заменить один компонент *B* на другой, менее полярный, соответственно увеличив концентрацию последнего.

При анализе сложных смесей, как правило, проводят чисто эмпирическую оценку селективности бинарных подвижных фаз, обладающих примерно одинаковой элюирующей силой. Полученные данные используют в качестве исходных для оптимизации селективности подвижных фаз более сложного состава.

### 4.3. МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВЭЖХ

#### 4.3.1. Подготовка растворителей

Рассмотрим некоторые практические приемы, которые можно рекомендовать для повышения надежности работы хроматографической системы.

**Фильтрация.** Основной фильтр подвижной фазы, имеющийся в каждом приборе, расположен во всасывающей линии насосной системы. Для нормальной работы насосов необходимо, чтобы сопротивление всасывающей линии было минимальным, в противном случае при всасывании возможно образование пузырей пара и нарушение работы клапанов. Поэтому используемые фильтры имеют довольно большую поверхность. Для улучшения работы насоса иногда рекомендуют размещать резервуары с подвижной фазой на несколько десятков сантиметров выше насоса. С течением времени фильтры засоряются, их сопротивление нарастает, возрастает вероятность нарушений работы насоса. Чтобы продлить срок непрерывной службы встроенного в прибор фильтра, можно рекомендовать предварительное фильтрование всех растворителей, помещаемых в резервуар, через материалы с размером пор 2—5 мкм.

Оценить состояние всасывающего фильтра хроматографа можно следующим образом. К выходу насоса присоединяют отрезок капилляра длиной 40—60 см и, внутренним диаметром 0,25—0,5 мм. Конец капилляра размещают на 40—60 см ниже уровня подвижной фазы в резервуарах. Засасывают (с помощью вакуума, шприца, резиновой груши) в капилляр жидкость из резервуара. После отсоединения источника вакуума при остановленном насосе подвижная фаза должна продолжать самотеком вытекать из капилляра со скоростью не менее 0,5 мл/мин. Меньшая скорость свидетельствует о засорении фильтра.

Для очистки фильтра 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%-й азотной кислотой. После 10-минутной выдержки в ультразвуковой ванне фильтр отмывают от азотной кислоты дистиллированной водой до pH 5. После этого фильтр готов к использованию в водных растворителях. Для работы с органическими подвижными фазами продолжают промывку: два раза ацетоном или спиртом, затем два раза подвижной фазой.

**Совместимость растворителей.** При составлении подвижных фаз, промывке фильтров, колонок и других элементов аппаратуры категорически запрещается использовать одновременно или последовательно не полностью смешивающиеся растворители. Особую



осторожность следует проявлять с буферными растворами. При их смешении с водорастворимыми органическими растворителями возможно выпадение осадков. Поэтому состав используемой подвижной фазы всегда должен быть достаточно далек от таких критических пропорций. Все узлы системы следует отмывать от буферных растворов только водой. Затем можно переходить в случае нужды к метанолу или ацетонитрилу и далее — к менее полярным органическим растворителям.

**Повторное использование растворителей.** Чаще всего подвижную фазу используют однократно. Однако такая практика не оправдана ни экономически, ни экологически, ни даже с точки зрения хроматографии как таковой. Можно предложить два пути повторного использования растворителей — регенерацию и рециркуляцию. При регенерации элюат после детектора собирают и порциями подвергают перегонке. В результате получают смесь растворителей, несколько отличающуюся от первоначального элюата. Проанализировав ее (например, методом ГЖХ), можно рассчитать, сколько и какого растворителя необходимо добавить чтобы получить подвижную фазу первоначального состава. Ясно, что регенерация позволяет избавиться от всех нелетучих примесей, и поэтому ее следует использовать преимущественно для подготовки элюентов для препаративной ВЭЖХ.

При аналитической ВЭЖХ в изократическом режиме практически проще воспользоваться приемом рециркуляции. После детектора элюат возвращается в резервуар, где перемешивается с помощью магнитной мешалки. Такой прием можно рекомендовать для проведения серийных анализов. Легко показать, что при этом способе работы никакого существенного загрязнения колонки не происходит, поскольку в элюент попадают только те соединения, которые колонку прошли и, следовательно, сорбируются достаточно слабо. По этой же причине и ввиду большого разбавления компонентов пробы есть все основания пренебречь изменением сорбционных свойств колонки в результате динамического модифицирования. Наконец, такой прием вполне допустим и с точки зрения детектирования. Допустим, хроматограмма содержит  $n$  пиков, имеющих высоту 100% шкалы самописца и ширину на половине высоты 0,5 мл. Легко подсчитать, что при емкости резервуара 500 мл и хорошем перемешивании базовая линия сместится на  $0,1n\%$  шкалы. Следовательно, если хроматограмма не слишком сложна и не содержит сильно зашкаленных пиков, смещение базовой линии в результате рециркуляции будет незначительным. Данный прием нельзя рекомендовать в тех случаях, когда (например, при анализе микропримесей) на хроматограмме имеются пики высотой в десятки шкал.

Работа с рециркулирующими растворителями дает и дополнительные преимущества, например позволяет сохранять фильтры системы. Ясно, что безопасней пользоваться подвижной фазой,

отфильтрованной через идеальный фильтр — колонку, чем прокачивать через систему все новые и новые объемы элюента. В случае, если подвижная фаза способна растворять сорбент, при рециркуляции процесс этот будет замедлен в несколько раз, и срок службы колонок удастся увеличить.

**Соли и буферные растворы.** В состав подвижных фаз помимо воды и органических растворителей могут входить также неорганические соли или ион-парные агенты. Они являются источником дополнительных примесей в подвижной фазе. Так, ион-парные агенты могут содержать органические соединения, для удаления которых подвижную фазу предварительно пропускают через колонку с октадецилсиликагелем.

Фосфатные буферные растворы могут служить средой для размножения микроорганизмов, поэтому их рекомендуется хранить в холодильнике. По этой же причине не следует оставлять неработающие колонки в контакте с этими растворами.

Нержавеющая сталь, из которой изготавливают почти все детали хроматографического оборудования, вполне устойчива в контакте с подавляющим большинством буферных растворов и солей, применяемых в ВЭЖХ. Исключение составляют формиаты и галогениды, обладающие заметной коррозионной активностью.

При приготовлении подвижных фаз для ион-парной, обращено-фазовой или ионообменной хроматографии получение необходимой молярной концентрации компонентов не вызывает затруднений, в то время как установка необходимого значения рН водно-органических элюентов может быть связана с затруднениями. В связи с этим принято указывать значения рН не для элюента в целом, а для его водной части, до смешения с органическим растворителем. Следует иметь в виду, что прибавление к водному буферному раствору органического растворителя может увеличить «кажущееся» значение рН на 1—2 единицы, в результате чего смешанный водно-органический элюент станет довольно агрессивным по отношению к химически модифицированным силикагелям.

#### 4.3.2. Подготовка колонок

**Концевые фитинги.** Фитинги современных колонок весьма просты по конструкции и в эксплуатации. Работа с ними не требует особых навыков, и герметичность, необходимая при давлении до 500 атм, достигается легким затягиванием уплотнения с помощью двух ключей. Проблемы с уплотнением колонок возникают чаще всего из-за их износа при частых сборке, разборке и демонтаже. В начале эксплуатации фитингов герметизация не требует значительных усилий. Однако по мере износа необходимое усиление затягивания возрастает, и с этого момента деформация уплотнения ускоряется, быстро приближается и момент его необрати-

мого выхода из строя. Для того чтобы избежать чрезмерного «перетягивания» уплотнений и быстрого их выхода из строя, можно рекомендовать сборку всех коммуникаций прибора, находящихся под давлением, при включенном насосе. Каждое уплотнение при этом затягивают постепенно, в несколько приемов и только до устранения течи.

**Фильтры.** Как правило, фильтры на выходе безотказно функционируют в течение всей жизни колонки. Фильтры на входе в колонку засоряются значительно чаще. Удобнее всего иметь сменные фильтры. Для замены фильтра входной фитинг разбирают, извлекают использованный фильтр и устанавливают новый. Использованный фильтр затем можно промыть, подобно тому как это было описано выше для фильтра подвижной фазы.

**Стабильность сорбента в колонке.** Силикагель и химически модифицированные силикагели вполне устойчивы в органических растворителях и водных подвижных фазах, имеющих pH 2—7,5. Тем не менее даже при соблюдении всех правил эксплуатации с течением времени в колонке могут образовываться пустоты, резко отрицательно сказывающиеся на ее эффективности. Пока до конца не ясно, связано ли их образование с химическим разрушением сорбента, либо является результатом механической «доупаковки», перераспределения частиц сорбента. Чаще всего пустоты образуются на входе в колонку, причем они имеют неправильную форму (рис. III.37). Признаком нарушения формы слоя является появление вторых вершин у всех пиков на хроматограмме или резкое снижение эффективности. Диагностика и устранение пустот в верхней части колонки не вызывают затруднений. Разобрав концевое уплотнение и сняв фильтр, осматривают слой сорбента. При обнаружении картины, подобной рис. III.37, б, в, с помощью шпателя удаляют верхние 0,5—2 мм слоя, придают ему горизонтальную форму. Затем приготавливают кашицу используемого сорбента и заполняют ею всю верхнюю часть колонки,

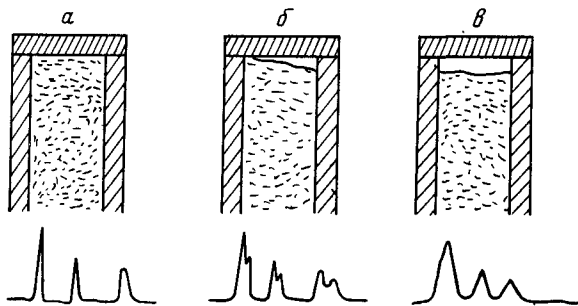


Рис. III.37. Форма слоя сорбента на входе в колонку и соответствующие характерные хроматограммы:

а — нормальный слой, б — несимметричная полость в — симметричная полость

уплотняя слой надавливанием шпателя, после чего устанавливают на место фильтр и герметизируют колонку. Следует иметь в виду, что канал в слое сорбента, нарушающий его однородность, может быть довольно тонким, незаметным невооруженным глазом. Поэтому к описанной выше процедуре иногда прибегают и при отсутствии видимых нарушений слоя.

Другая неисправность в работе колонок может проявляться в увеличении их сопротивления. Чаще всего это связано с засорением фильтра на входе и его замена приводит к нормализации работы системы. Однако не так уж редко встречаются случаи, когда заметного загрязнения фильтра нет, а верхняя часть слоя покрыта плотным слоем смолообразного осадка. И в этих случаях замена верхних 0,5—1 мм слоя может помочь решить проблему.

**Предколонки** являются одним из средств профилактики описанных нарушений работы колонок. Они могут располагаться в двух точках хроматографической системы. Предколонки, располагаемые между насосом и инжектором, заполняют обычно пелликулярными сорбентами, родственными по химическому типу тем материалам, которыми заполнена основная колонка К. Если подвижная фаза обладает способностью растворять сорбент, этот процесс происходит в предколонке ПК<sub>1</sub>. В результате подвижная фаза насыщается продуктами деструкции сорбента и, подходя к основной колонке К, почти полностью теряет свою растворяющую способность. Все отрицательные процессы, подобные изображенным на рис. III.37, в этом случае происходят в предколонке.

Предколонки, расположенные между дозатором и основной колонкой (защитные колонки), участвуют в разделении, поэтому часто их конструкция и технология заполнения в общем повторяют конструкцию и способ заполнения высокоэффективных колонок. Вместе с тем в них можно использовать и более крупнозернистые и пелликулярные материалы. Если эти предколонки упакованы тщательно, они не вызывают сколько-нибудь серьезного ухудшения эффективности системы, но зато позволяют защитить основную колонку от разрушающего и засоряющего воздействия подвижной фазы и разделяемых смесей.

**Промывка и регенерация колонок.** В типичных условиях промывочной ВЭЖХ колонка постоянно промывается потоком подвижной фазы, поэтому необходимость ее специальной очистки и регенерации возникает редко, лишь в особо неблагоприятных случаях. Для промывки и регенерации используют растворители с возрастающей элюирующей силой. Объем каждого из них примерно равен десятикратному объему колонки. Для колонок с силикагелем, работающих в нормально-фазовом режиме, можно рекомендовать растворители в последовательности: хлороформ — этилацетат — ацетон — этанол — вода — этанол — ацетон — этилацетат — хлороформ. При работе с алкилсиликагелями в обращенно-фазовом режиме последовательность такая: вода — метанол —

хлороформ — метанол — вода — 0,1 М серная кислота — вода — 0,1 М гидроксид аммония — вода. Для повышения эффективности промывки можно проводить ее при температуре колонки 40—60 °С. Приведенные способы промывки универсальны, и если их применение оказывается безрезультатным, это, по-видимому, можно считать признаком необратимого выхода колонки из строя. В то же время далеко не всегда есть необходимость в такой всесторонней, исчерпывающей промывке. Во многих случаях положительный результат может быть достигнут быстрее и проще — вводом через дозатор серии 10—20 импульсов растворителя большой элюирующей силы объемом по 100—200 мкл.

В ранний период становления ВЭЖХ фирмы-производители в своих инструкциях запрещали изменять направление потока в колонке, подключая ее выход к насосу. С течением времени тон этих рекомендаций становился все менее категоричным, и сейчас уже наряду с прежней точкой зрения существует прямо противоположная. Согласно ей, изменение направления потока не только допустимо, но является самым простым способом удаления загрязнений.

#### 4.3.3. Подготовка проб

Подготовка проб для анализа преследует цели: перевод образца в растворитель, совместимый с используемой хроматографической системой; удаление компонентов и механических примесей, отрицательно влияющих на работу хроматографа и колонки; предварительное отделение таких компонентов, которые не представляют интереса либо затрудняют анализ; обогащение пробы определяемыми компонентами; перевод компонентов пробы в форму, способствующую селективному разделению, а также чувствительному и селективному детектированию.

Избираемый способ подготовки проб должен соответствовать характеру аналитической задачи. При исследовании реакционных смесей, готовых продуктов или их композиций подготовка проб обычно сравнительно проста. Как правило, навеску исследуемого образца растворяют в определенном количестве растворителя и отфильтровывают от механических примесей. В качестве растворителя лучше всего использовать подвижную фазу. Это обеспечивает наилучшую воспроизводимость результатов и форму хроматографических пиков. Иногда возникает необходимость растворения образца в подвижной фазе меньшей элюирующей силы. Это, вообще говоря, допустимо, хотя воспроизводимость анализа может оказаться несколько ухудшенной. Очень рискованно использовать для растворения проб смеси, обладающие большей элюирующей силой, чем подвижная фаза. В результате смешения такого растворителя с элюентом в колонке форма хроматографического пика окажется искаженной, возможно

также выпадение компонентов пробы в осадок и засорение фильтра на входе в колонку. Силикагель и химически модифицированные силикагели неустойчивы при рН 8, поэтому растворы, имеющие хотя бы слабощелочную реакцию, необходимо подкислить перед разделением.

При работе с образцами особо сложного состава, например биологическими жидкостями, подготовка к анализу, как правило, более трудная. Она может включать операции по осаждению, центрифугированию, фильтрованию, экстракции. При этом успех анализа в большей степени зависит от качества подготовки проб, чем от выбора условий хроматографирования. В последние годы ряд фирм освоили выпуск пластмассовых хроматографических патронов для очистки и концентрирования образцов. Эти патроны (объем 1—20 мл) заполняют крупнозернистыми сорбентами, по химии поверхности совершенно аналогичными тем сорбентам, которые используют в ВЭЖХ. Принцип их использования следующий. Изучаемый объект растворяют в таком растворителе, который обладает незначительной элюирующей силой по отношению к анализируемым веществам. Полученный раствор пропускают через патрон, при этом более подвижные компоненты пробы в нем не задерживаются, в то время как интересующие нас соединения накапливаются в верхней части слоя сорбента. Таким образом через патрон можно пропустить довольно большой объем образца, превышающий во много раз объем сорбента в нем. По окончании этой операции колонку промывают небольшим объемом растворителя, обладающего значительной элюирующей силой по отношению к определяемым соединениям ( $k' \approx 10^{-1}$ ). В результате такой процедуры из образца удаляются механические примеси, слабосорбирующиеся и необратимо сорбирующиеся вещества. Получают фракцию небольшого объема, содержащую помимо определяемых соединений лишь фоновые компоненты, имеющие близкую хроматографическую подвижность.

В некоторых случаях при подготовке проб прибегают к получению производных, обладающих улучшенными по сравнению с исходными веществами хроматографическими характеристиками. Так, для разделения оптических изомеров их переводят в диастереомерные производные с подходящими хиральными реагентами. С этой целью используют такие реагенты, как N-трифторацетил-L-пролилхлорид для получения производных аминов и (—)-ментилхлорформид для оптически активных спиртов. Значительно чаще производные используют для повышения чувствительности и селективности детектирования. В табл. III.14 приведены функциональные группы органических соединений и соответствующие производные, содержащие хромофорные или флуорофорные группы. Некоторые методики получения производных приведены ниже.

**УФ-поглощающие эфиры карбоновых кислот.** Растворяют

Таблица III 14 Реагенты для получения производных

Типы анализируемых соединений	Реагент	Детектор*
Карбоновые кислоты	<i>n</i> -Бромфенацилбромид	УФ (260 нм)
	4-Бромметил-7-метоксикумарин	Ф (360/420 нм)
	N'-Сукцинимидил- <i>n</i> -нитрофенилацетат	УФ (265 нм)
Спирты, фенолы	3,5-Динитробензоилхлорид	УФ (254 нм)
Амины	То же	То же
	<i>n</i> -Метоксибензоилхлорид	—»—
	2,4-Динитро-1-фторбензол	УФ (360 нм)
	7-Хлор-4-нитробензил-2-оксо-1,3-диазол	Ф (475/545 нм)
Меркаптаны	То же	Ф (420/525 нм)
Аминокислоты	Пиридоксаль	Ф (330/400 нм)
Амины, имидазолы	4-Диметиламиноазобензол-4'-сульфохлорид (дабсилхлорид)	УФ (425 нм)
Меркаптаны	То же	То же
Спирты, фенолы	—»—	—»—
Фенолы	5-N, N-диметиламинонафталин-1-сульфохлорид (дансилхлорид)	Ф (365/520 нм)
Амины, аминокислоты, пептиды	То же	Ф (340/520 нм)
Альдегиды, кетоны	<i>n</i> -Нитробензилоксиамин гидрохлорид	УФ (265 нм)
	2,4-Динитрофенилгидразин	УФ (254 нм)

\* УФ — спектрофотометр, Ф — флуориметр

10 мкмоль карбоновой кислоты, 20 мкмоль реагента (фенацил- или бензоилбромид) и 40 мкмоль N,N-диизопропилэтиламина в 1 мл диметилформамида. Нагревают раствор 1 ч при 60 °С. Образец непосредственно можно вводить в хроматографическую колонку с обращенно-фазовым сорбентом.

***n*-Нитробензиловые эфиры карбоновых кислот.** Растворяют 3 мкмоль карбоновой кислоты и 9 мкмоль *o*-(*n*-нитробензил)-N, N-диизопропилмочевины в 250 мкл метиленхлорида в реакционном сосуде. Нагревают до 80 °С и выдерживают 2 ч. Реакционную смесь можно непосредственно анализировать в режиме нормально-фазовой хроматографии или после продувки в токе азота, образец можно анализировать в обращенно-фазовом режиме.

**2,4-Динитрофенилгидразоны карбонильных соединений.** Растворяют 10 мкмоль образца в 0,5 мл метанола, подкисляют одной каплей концентрированной хлороводородной кислоты. Растворяют 15 мкмоль 2,4-динитрофенилгидразина в 0,5 мл метанола. Смешивают два раствора и нагревают несколько минут при 50 °С до завершения реакции.

***n*-Нитробензилоксиимы карбонильных соединений.** Растворяют 1 мкмоль образца, 5 мкмоль *n*-нитробензилоксиамина и 50 мкл пиридина. Нагревают реакционную смесь 30 мин при 60 °С. Упаривают пиридин в потоке азота и растворяют осадок в метиленхлориде, промывают разбавленным раствором хлороводородной

кислоты перед введением образца в хроматографическую колонку.

**УФ-поглощающие эфиры спиртов.** Растворяют 10 мкмоль спирта, 50 мкмоль подходящего фенацил- или бензоилбромид и 10 мкмоль пиридина в метиленхлориде. Реакционную смесь выдерживают 1 ч при 55 °С. Упаривают пиридин и метиленхлорид в токе азота и гидролизуют избыток реагента одной или двумя каплями 2 М хлороводородной кислоты. Удаляют избыток кислоты промыванием 1%-м раствором карбоната натрия. Осадок растворяют в подходящем растворителе и хроматографируют.

**2,4-Динитрофенильные производные аминов.** К 0,2 мл 3%-го раствора 1-фтор-2,4-динитробензола в диоксане добавляют раствор образца в 1,5 мл 1%-го водного раствора тетрабората натрия. Нагревают раствор 25 мин при 60 °С, добавляют 0,2 мл 2 М раствора гидроксида натрия и выдерживают 15 мин. Охлаждают раствор и встряхивают с 1 мл циклогексана. Экстрагируют слой циклогексана 0,1 М раствором карбоната натрия порциями по 2—3 мл. Органическая фаза может быть непосредственно хроматографирована в нормально-фазовом режиме.

#### 4.3.4. Разработка и описание условий анализа

**Использование литературных данных.** Желательно, чтобы еще до начала работы было сделано обобщение литературных сведений по решению стоящей задачи с помощью ВЭЖХ и другими методами. Они, несомненно, окажут большую помощь, позволят справиться с проблемой за более короткое время. В то же время значение этой информации не следует переоценивать, и не всегда надо пытаться слепо воспроизвести опубликованный режим. Это, разумеется, не относится к методикам, имеющим силу стандартов: их необходимо воспроизводить буквально и досконально. Трудности при воспроизведении методик, опубликованных в литературе, связаны с рядом обстоятельств: неидентичность технических данных оборудования, имеющегося в распоряжении разных лабораторий; неидентичность сорбционных свойств однотипных неподвижных фаз и даже разных партий одной и той же неподвижной фазы; недостаточная полнота описания методик; недоступность тех или иных реактивов, растворителей, материалов и приспособлений.

Кроме того, при анализе литературных данных почти всегда оказывается, что проблема, которая стояла перед авторами публикации-прототипа, отличается от той проблемы, которую предстоит решить аналитику, хотя основные определяемые соединения могут быть одни и те же. Это также отчасти обесценивает опубликованную методику, так как в конкретном случае может потребоваться другая подготовка пробы, могут оказаться иными состав примесей, фоновые вещества в биообъекте и т. п.

Все эти затруднения часто приводят к тому, что опубликован-



ные методики не используют для прямого воспроизведения. Они служат лишь отправной точкой для дальнейшей модификации применительно к условиям и задачам. Возможности такой модификации за счет варьирования тех или иных параметров в ВЭЖХ необычайно широки.

Сложилась практика указания в методиках разделения таких простых и физически наглядных параметров, как геометрические размеры колонок, расход подвижной фазы, время удерживания. Однако основной результат хроматографического процесса — разделение — напрямую связан не с этими параметрами, а со специфическими характеристиками термодинамической и кинетической природы, в первом приближении не зависящими от геометрических характеристик хроматографической системы — коэффициентами емкости, эффективностью и т. п. Поэтому при описании результатов хроматографических экспериментов коэффициенты емкости, эффективность, линейная скорость подвижной фазы должны указываться наряду с приведенными выше характеристиками. В большинстве случаев хроматографисты пользуются стандартным рядом длин колонок: 25, 15 или 10 см. Многие фирмы освоили выпуск более коротких колонок (вплоть до 3 см), заполненных особо мелкозернистыми сорбентами. Однако из теоретических основ метода ясно, что сама по себе длина колонки влияния на качество разделения не оказывает, а ее увеличение способствует увеличению продолжительности разделения. Действительно определяющим фактором является эффективность колонки, и именно ее необходимо указывать, описывая разделение. Это позволяет осознанно подходить к воспроизведению методик разделения и одновременно использовать возможности сокращения продолжительности анализа. Так, допустим, что согласно опубликованной методике разделение выполнялось на колонке длиной 25 см и эффективностью 5000 теоретических тарелок. По современным воззрениям такая колонка не может считаться высококачественной, однако примеров подобного рода в литературе, и даже новейшей, более чем достаточно. В настоящее время для получения указанной эффективности достаточно колонки длиной 10 см или даже 5 см. Поэтому имеется реальная возможность, сохранив все остальные параметры опыта постоянными, воспроизвести ранее достигнутое качество разделения на более короткой колонке и за более короткое (в 2,5—5 раз) время. Следовательно, выбор длины колонки и эффективности в каждом конкретном случае определяется той селективностью, которой обладает данная система по отношению к разделяемым соединениям, а также требованиями к скорости разделения.

Следует отметить, что повышение эффективности колонки является разумным способом улучшения разделения только для достаточно сложных смесей. Для простых и умеренно сложных смесей более правильным путем улучшения разделения является

оптимизация селективности, позволяющая создавать более скоростные методики разделения.

В руководствах прежних лет отмечалось, что последовательное соединение колонок с целью увеличения суммарной эффективности положительного результата не дает. Вероятнее всего, такое мнение сформировалось из-за пользования недостаточно совершенными соединительными элементами. Наш опыт и данные, опубликованные в последние годы, говорят о том, что последовательное соединение колонок вполне осуществимо и эффективность при этом примерно равна сумме эффективностей отдельных колонок. Этим путем, однако, хроматографисты идут довольно редко, так как за удвоение эффективности приходится платить резким увеличением продолжительности разделения, работой насосов вблизи максимальных рабочих давлений.

**Способ элюирования.** В ходе разработки методики разделения многокомпонентной смеси необходимо решить вопрос о режиме элюирования. Анализ современных тенденций в жидкостной хроматографии показывает, что градиентное элюирование довольно редко применяют для анализа химических продуктов, но оно необходимо при разделении сложных смесей биологического происхождения. Существенным недостатком градиентного элюирования является то, что возврат к исходному режиму элюирования по окончании разделения требует довольно значительного времени (чаще всего 15—30 мин). При сравнении возможностей градиентного и изократического элюирования продолжительность приведения колонки в исходное состояние следует суммировать с продолжительностью градиентного разделения. При таком подходе часто оказывается, что лучше провести длительное изократическое разделение, чем незначительно уступающее ему по продолжительности градиентное.

**Величины удерживания.** Благодаря большой гибкости ВЭЖХ одна и та же проблема разделения, как правило, может быть решена множеством способов, различающихся составом подвижных фаз. Наиболее подходящими из них являются те, которые обеспечивают необходимое (но не избыточное!) разделение за минимальное время. При выборе соотношения сильного компонента подвижной фазы и разбавителя следует иметь в виду, что, как правило, уменьшение объемной доли данного сильного растворителя в подвижной фазе, приводящее к увеличению коэффициентов емкости, сопровождается также и улучшением разделения. Этот эффект отчетливо выражен в диапазоне коэффициентов емкости от 0 до 3. Дальнейшее увеличение  $k'$  сопровождается лишь очень медленным улучшением разделения. Следовательно, с точки зрения компромисса между достигаемым качеством разделения и его продолжительностью оптимальное значение  $k' \approx 3$ . Можно с уверенностью сказать, что если при таких величинах удерживания разделение неудовлетворительное, следующим шагом по

оптимизации должно быть либо радикальное увеличение эффективности колонки, либо изменение селективности за счет изменения состава подвижной фазы. Несколько иначе следует выбирать величину  $k'$  при разработке методик определения примесей. В этом случае избранный режим помимо отделения примесей от основного вещества должен обеспечивать обзор максимального диапазона полярности сорбатов. Поэтому желательно выбирать такой состав подвижной фазы, чтобы  $k'$  основного вещества был около 1,0. С другой стороны, в начальной части хроматограммы вблизи  $t_0$ , часто наблюдаются ложные пики различной природы. Поэтому при выборе состава элюента необходимо строго соблюдать следующее правило: ни один интерпретируемый пик не должен иметь  $k' < 0,2$ .

При экспериментальном подборе условий разделения можно рекомендовать следующий порядок опытов. Первоначально берут такой состав подвижной фазы, в котором предположительные значения коэффициентов емкости будут в пределах 0,1—0,5. В этом режиме хроматографируют искусственную смесь, а также реальный образец. Из хроматограммы искусственной смеси делают вывод, насколько надо уменьшить силу подвижной фазы, чтобы приблизиться к оптимальным значениям  $k'$ . Хроматограмма реального образца, снятая в первом режиме, позволяет выявить наличие сильносорбирующихся примесей, которые могли бы быть «потеряны» при хроматографировании в более слабой подвижной фазе.

При исследовании закономерностей хроматографического поведения, стандартизации величин удерживания условия эксперимента необходимо выбирать таким образом, чтобы погрешность измерения коэффициентов емкости была по возможности мала. Это достигается уже при  $k' = 4$ . Выбор несорбирующихся веществ, необходимых для измерения объема подвижной фазы в колонке и вычисления  $k'$ , является предметом продолжающейся дискуссии в литературе. Вероятно, идеального решения этой задачи не существует, и наиболее рациональный выход — принять в качестве условно несорбирующихся такие соединения, которые применяют с этой целью чаще всего.

В случае обращенно-фазовой хроматографии в качестве условно несорбирующегося вещества при работе с УФ-детектором можно рекомендовать нитрат натрия, а при работе с рефрактометром — воду. В нормально-фазовом варианте такими веществами могут быть соответственно тетрахлорид углерода и гексан.

**Температура колонки.** Температура, при которой проводят разделение, как правило, оказывает влияние не столько на селективность, сколько на абсолютные величины удерживания. Повышение температуры разделения приводит к уменьшению времен удерживания, однако того же эффекта при необходимости можно добиться изменением состава подвижной фазы. В связи с этим

большинство ВЭЖХ-разделений выполняется при комнатной температуре, и даже не все фирмы, специализирующиеся на жидкостной хроматографии, включают соответствующие термостаты колонок в свою производственную программу.

Термостатирование колонки при повышенных (до 40—60 °С) температурах можно рекомендовать в тех случаях, когда используют подвижные фазы большой вязкости. Это позволяет значительно снизить давление в системе и расширить круг используемых растворителей. Например, при 60 °С становится возможным использование в качестве органического компонента подвижной фазы в обращенно-фазовой хроматографии.

Применение термостатирования может также быть необходимым при прецизионных физико-химических измерениях.

**Расход подвижной фазы** выбирают в зависимости от внутреннего диаметра колонки, технических данных насоса, свойств разделяемых соединений. С точки зрения возможности воспроизведения методик, было бы более правильным задавать не объемный расход через все сечение колонки, а расход через единицу сечения либо линейную скорость подвижной фазы. Тем не менее, поскольку насосы ВЭЖХ градуированы в единицах объемного расхода, именно этот параметр, как правило, приводится в описаниях методик.

Для низкомолекулярных сорбатов характерно довольно незначительное уменьшение эффективности разделения с увеличением скорости подвижной фазы, что в принципе позволяет сильно сократить продолжительность разделений. Однако этой возможностью пользуются довольно редко, так как пропорционально расходу увеличивается давление на входе в колонку. В результате используемые разными авторами величины расхода подвижной фазы колеблются в сравнительно узких пределах. Так, почти все разделения на колонках внутренним диаметром 4,6 мм выполняют при расходе фазы от 1 до 2 мл/мин, что соответствует линейной скорости 1,5—4 мм/с (при характерных для ВЭЖХ значениях фазового отношения). Именно эта величина представляет собой наиболее разумный компромисс между продолжительностью разделения и давлением. Разумеется, при разделении на колонках иного диаметра расход следует изменить пропорционально площади поперечного сечения колонки.

**Объем и концентрация пробы.** Массу вещества, которую необходимо ввести в колонку, выбирают исходя из стоящих задач. Так, если необходимо препаративное выделение очищенных фракций либо определение примесей, стремятся ввести в колонку возможно большее количество пробы, в то время как при анализе реакционных смесей такой необходимости обычно нет. Одно и то же количество исследуемого образца можно ввести в колонку в виде относительно большого объема менее концентрированного раствора либо в виде концентрированной пробы малого объема.

При выборе объема и концентрации пробы руководствуются требуемой точностью дозирования, предельно допустимыми режимами разделения и детектирования.

Погрешность дозирования проб, как правило, снижается с увеличением их объема. Следовательно, когда этот показатель является существенным (например, при количественной обработке хроматограмм методом абсолютной калибровки), целесообразно выбирать максимально допустимый для данных условий объем. Использование проб слишком большого объема может привести к заметному снижению эффективности разделения, особенно при работе с колонками эффективностью 10 000—20 000 теоретических тарелок. Чтобы реализовать всю эффективность, присущую данной колонке, объем пробы не должен превышать  $1/10$  часть объема, соответствующего ширине хроматографического пика на половине его высоты. Предельный объем проб возрастает пропорционально площади поперечного сечения слоя сорбента. Для колонок внутренним диаметром 4,6 мм и эффективностью свыше  $10^4$  теоретических тарелок он составляет примерно 25 мкл.

Если предстоит измерение и обработка основных пиков на хроматограмме, количество соответствующих компонентов, вводимых в колонку, не должно выходить за пределы линейности детектора. Максимальное с этой точки зрения количество вещества при детектировании по УФ-поглощению зависит в первую очередь от коэффициента поглощения сорбента и его удерживания. В качестве ориентировочной для соединений с молярным коэффициентом поглощения порядка  $10^4$  можно назвать массу 10—50 мкг для колонок с внутренним диаметром 4,6 мм. Диапазон линейности малочувствительных детекторов, например рефрактометра, соответствует значительно большему количеству вещества. Поэтому при работе с ними (а также при препаративной хроматографии с УФ-детектором) приходится считаться уже не столько с перегрузкой детектора, сколько с перегрузкой слоя сорбента. Она приводит к нарастанию асимметрии, в особенности сильно проявляющемуся для сорбатов с большими  $k'$ . Предельная с этой точки зрения концентрация также сильно зависит от режима хроматографирования. Вероятность явлений подобного рода следует учитывать, если концентрация вещества в пробе превышает 2 мг/мл, хотя во многих случаях серьезные искажения хроматограммы не наступают и при 5—10 мг/мл.

Таким образом, выбор концентрации и объема анализируемой пробы является в каждом случае результатом определенного компромисса. Такие компромиссные условия в современной ВЭЖХ найти нетрудно. В качестве ориентировочных значений параметров, пригодных для первой попытки при разработке метода разделения на колонках диаметром 4,6 мм, укажем объем пробы 10—25 мкл, концентрацию 0,1—1 мг/мл для УФ-детекторов и 1—5 мг/мл для рефрактометра.

#### 4.3.5. Качественный анализ

Для качественного анализа могут быть использованы хроматографические данные — величины удерживания либо сведения, получаемые вторичными по отношению к хроматографическому эксперименту методами, чаще всего спектральными.

Первый подход основан на том, что при постоянных условиях хроматографирования время удерживания данного вещества, а также все производные от него параметры являются постоянными величинами. Для того чтобы с большей надежностью убедиться в совпадении времен удерживания, эталон можно ввести в хроматограф вместе с изучаемой смесью. Количества идентифицируемого вещества и эталона при этом должны быть приблизительно равны. Если времена удерживания веществ действительно одинаковы, относительная высота идентифицируемого пика возрастет вдвое, а ширина (если колонка не перегружена образцом!) не изменится. Если высота увеличится меньше, чем в два раза, а ширина пика возрастет, это свидетельствует о неидентичности двух соединений. С помощью такого приема удастся уловить незначительные различия в величинах удерживания.

Предположим, что на колонке с эффективностью 5000 теоретических тарелок время удерживания эталона составило 10 мин, а неизвестного пика — 10,2 мин. При обычной технике эксперимента такое различие является недостаточным. Введя два вещества в колонку одновременно, получим суммарный пик. Если приведенное незначительное различие в удерживании действительно есть, ширина пика будет примерно на 60% больше, чем ширина индивидуального пика. Такое увеличение ширины легко заметить визуально или с помощью простейших измерений. Тем самым различие двух соединений становится совершенно очевидным.

Совпадение времен удерживания, строго говоря, не является доказательством идентичности веществ, а лишь указывает на ее вероятность. Степень вероятности можно значительно повысить, если повторить всю процедуру в других условиях, лучше всего в системе с другим механизмом удерживания.

Если набор эталонных соединений отсутствует, можно попытаться провести идентификацию по табличным значениям удерживания. Однако межлабораторная воспроизводимость абсолютных величин ( $t_R$ ,  $k'$ ) пока неудовлетворительна, и поэтому множество опубликованных в такой форме данных почти бесполезно при качественном анализе. Иногда из опубликованных величин  $k'$  можно рассчитать относительные удерживаемые объемы, обладающие значительно большей надежностью, хотя и в этом случае близость табличных и наблюдаемых величин является довольно шатким доказательством. Такой способ идентификации, тем не менее, вполне применим по отношению к таким объектам, состав которых хорошо изучен. При воспроизведении методик анализа

Таблица III.15. Абсолютные и относительные величины удерживания фторидона на различных сорбентах

Сорбент	$C = \text{const} = 50\%$		$k' = \text{const} = 7,53$	
	$k'$	$\alpha_{\text{бенз}}$	$C, \% (\text{об})$	$\alpha_{\text{бенз}}$
Силасорб С18 СФ	7,53	1,68	50	1,68
Силасорб С18	3,63	1,57	40,5	1,66
Зорбакс ОДС	5,64	1,61	46,0	1,67
Ультрапак РП 18	4,28	1,53	42,0	1,72
Ультрасфер ОДС	5,88	1,62	47,0	1,68
Среднее	5,39 ( $\pm 28\%$ )	1,60 ( $\pm 3,5\%$ )		1,68 ( $\pm 1,3\%$ )

в этом случае фактически необходимо провести не идентификацию ранее неизвестных веществ, а лишь «привязать» измеренные величины удерживания к известному набору структур и табличных значений.

Опыт показывает, что при обращенно-фазовой хроматографии хуже всего воспроизводима именно абсолютная удерживающая способность сорбентов. Данные табл. III.15 для пяти октадецилсиликагелей различных марок иллюстрируют возможный диапазон вариации коэффициентов емкости. Видно, что относительные удерживаемые объемы  $\alpha$  более устойчивы. Установлено, что изменение относительных удерживаемых объемов симбатно с ростом абсолютных величин удерживания. Это является отражением известных фундаментальных закономерностей обращенно-фазовой хроматографии. Воспроизводимость  $\alpha$  может быть повышена, если измерения проводить не при одинаковой концентрации органического растворителя, а изменяя ее таким образом, чтобы для стандартного вещества коэффициент емкости был одинаков на разных колонках. Представленные в таблице данные показывают, что различия в свойствах сорбентов могут при этом быть сведены к минимуму.

При недостаточной предварительной информации наиболее рациональным является применение спектральных методов. УФ-, ИК-, ЯМР- и масс-спектроскопия в настоящее время составляют основной арсенал средств изучения структуры органических соединений. Как правило, для их применения требуются довольно чистые образцы, которые можно приготовить с помощью ВЭЖХ. Если идентифицируемое соединение присутствует в изучаемой смеси в концентрации 5% и выше, необходимое количество очищенных веществ можно получить на обычной аналитической или полупрепаративной колонке. При этом не требуется специальный препаративный хроматограф. Проблема выделения примесей, естественно, значительно сложнее, и в этом случае необходимо

предварительное их концентрирование одним из доступных методов.

Расшифровка структуры с помощью спектральных методов является предметом специальной литературы и здесь не рассматривается. В жидкостной хроматографии пока не удалось создать столь мощного комплексного метода идентификации, каким является газовая хромато-масс-спектроскопия. Фактически лишь спектроскопия в УФ- и видимой областях достаточно легко сочетается с основными параметрами современной ВЭЖХ. Для получения электронных спектров удобнее всего пользоваться спектрофотометрами с диодной линейкой, позволяющими получить за один цикл разделения также спектры всех пиков. Однако эти приборы дороги и пока не получили широкого распространения. Некоторые конструкции хроматографов предусматривают возможность остановки потока в момент выхода пика и непосредственного получения спектра с помощью детектора. При несколько больших затратах труда и времени почти такую же информацию можно получить с помощью обычного спектрофотометрического детектора.

Сопоставление хроматограмм смесей, полученных при различных длинах волн, позволяет судить о степени сходства строения компонентов. Для этой цели одну и ту же хроматограмму снимают при различных длинах волн (например, с интервалом 20 нм). Если при изменении длины волны детектирования высоты всех пиков изменяются симбатно, система хромофоров и ауксохромов всех компонентов одинакова.

## **4.4. СПЕЦИАЛЬНЫЕ ЗАДАЧИ**

### **4.4.1. Разделение катионов и анионов**

Разделение разнообразных смесей неорганических ионов трудностей не вызывает и осуществимо в самых разных системах ионообменной хроматографии. Методы эти известны давно, однако до последнего времени они имели довольно ограниченное аналитическое применение. Это объясняется относительно невысокой скоростью элюирования, значительным размыванием хроматографических зон на ионообменных сорбентах. Трудности вызывает также детектирование ряда ионов. В последние годы значительное развитие получила ионная хроматография. Хотя этот термин стал общепринятым, мы считаем, что он не вполне удачен, так как характеризует объект анализа и поэтому не согласуется с принятой классификацией хроматографических методов. С точки зрения этой классификации все разделения, которые происходят в «ионном» хроматографе есть ионообменная хроматография в несколько новых условиях реализации процесса. Рассмотрим некоторые типичные варианты анализа ионов [86, 87].



**Двухколоночная схема с кондуктометрическим детектированием.** Этот способ детектирования ионов в принципе обеспечивает наибольшую чувствительность. Однако практическое достижение чувствительности затруднено высокой электропроводностью типичных подвижных фаз, используемых в ионообменной хроматографии. Для снижения электропроводности между разделительной колонкой и кондуктометрическим детектором устанавливают вспомогательную (подавляющую) ионообменную колонку, нейтрализующую элюат и снимающую (вычитающую) его электропроводимость. На фоне обработанной таким образом подвижной фазы достигается высокая чувствительность анализа. Переключение потоков, необходимое для периодической регенерации подавляющей колонки, осуществляется с помощью автоматизированных устройств, входящих в состав промышленно выпускаемых ионных хроматографов.

**Одноколоночные схемы** уступают по чувствительности рассмотренным выше. Их преимуществом является то, что при анализе используют обычное оборудование ВЭЖХ, имеющееся во многих лабораториях. В этих схемах могут быть использованы детекторы различных типов. При рефрактометрическом детектировании чувствительность определяется разностью коэффициентов преломления анализируемых ионов и ионов подвижной фазы. Поэтому в подвижных фазах на основе обычных неорганических солей не удается достичь чувствительного определения неорганических ионов.

Однако, если подвижная фаза приготовлена на основе органических солей, имеющих высокие коэффициенты преломления (например, салицилаты, бифталаты), чувствительность вполне удовлетворительна (рис. III 38,а).

В таком же режиме разделения возможно использовать и кондуктометрический детектор, оснащенный специальным устройст-

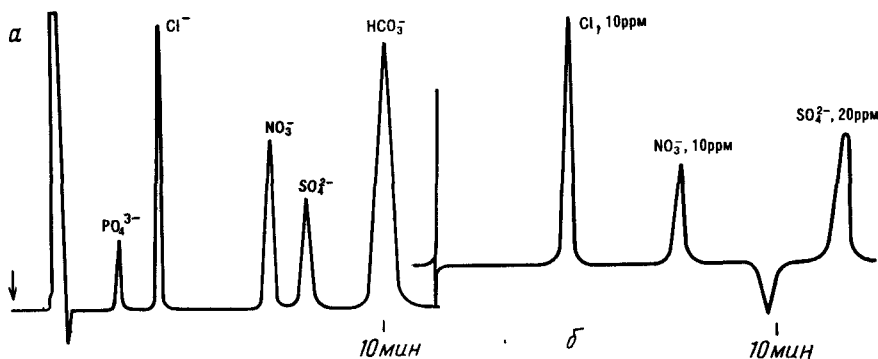


Рис III 38 Хроматограммы анионов, полученные на колонке Ионосфер А (250 × 4,6 мм), подвижная фаза — 0,04 М бифталат калия, рН 4,0, детекторы — рефрактометр (а) и кондуктометр Вескан, мод 213А (б)

вом для электронного подавления фоновой электропроводности. Как видно из рис. III.38,б, достижима весьма высокая чувствительность.

Многие ионы поглощают УФ-свет с длиной волны 200—220 нм, что дает возможность определять их при использовании в качестве подвижных фаз прозрачных для такого света фосфатных буферных растворов. Другая возможность детектирования ионов, прозрачных для УФ-света, заключается в использовании поглощающего свет бифталатного буферного раствора и регистрации уменьшения оптической плотности при выходе зон анализируемых ионов.

#### 4.4.2. Разделение аминокислот

Специфика хроматографического анализа аминокислот определяется особенностями этой группы сорбатов, в которую входят представители, сильно различающиеся по кислотно-основным свойствам и УФ-спектрам. Работы этого класса можно выполнять различными методами, используя либо стандартную аппаратуру для ВЭЖХ, либо специализированные приборы — аминокислотные анализаторы. Выбор оптимального варианта диктуется характером аналитической задачи: необходимой чувствительностью, наличием в образце веществ других классов, присутствием лишь нескольких аминокислот, либо всего набора белковых аминокислот.

Использование стандартной ВЭЖХ-техники предпочтительно в тех случаях, когда аминокислотный анализ не является основной задачей лаборатории и работы этого типа выполняются эпизодически, а также если необходимо определение только некоторых из веществ этой группы. Наиболее подходящими вариантами являются обращенно-фазовая и ион-парная ВЭЖХ. Для повышения чувствительности детектирования перед анализом аминокислоты могут быть переведены в УФ-поглощающие производные. В некоторых случаях неплохие результаты получаются при детектировании свободных аминокислот в области 200—215 нм.

Однако наиболее универсальным и высокочувствительным способом является анализ в специальном образе оптимизированных хроматографических системах и оборудовании [88—89]. Применяют в основном два варианта. Согласно первому, аминокислоты разделяют на кагионообменной колонке, согласно второму — производные аминокислот разделяют на октадецилсиликагеле.

При анализе аминокислот в качестве ионообменных сорбентов применяют сульфокатиониты на основе стиролдивинилбензолных полимеров разной степени сшивки. Степень сшивки определяет в значительной мере эффективность разделения и продолжительность анализа. Иониты, имеющие степень сшивки около 8% с размером частиц 10—11 мкм (например, DC-6A), упаковывают

в стеклянные колонки диаметром 4—9 мм, снабженные специальными устройствами для компенсации изменений объема слоя по мере старения колонки. Элюирование проводят в ступенчатом градиенте. Кислые аминокислоты элюируются кислыми буферными растворами (рН 2,5—3,5), имеющими относительно небольшую ионную силу. В ходе разделения за 3—4 приема повышают рН (до 5—8) и ионную силу. Обычно в ходе анализа повышают температуру в несколько ступеней от 35—40 до 65—80 °С. По завершении разделения, которое длится 1—2 ч с помощью 0,4 М раствора NaOH проводят регенерацию колонки, после чего уравнивают ее первым буферным раствором. Общая продолжительность анализа составляет 2—3 ч.

Существенного ускорения анализа можно добиться, используя сорбенты с более высокой степенью сшивки (до 12%). Эти материалы могут быть изготовлены в виде частиц диаметром 6—8 мкм. Они почти не изменяют свой объем в ходе эксплуатации и поэтому их упаковывают в колонки из нержавеющей стали, аналогичные обычно применяемым в ВЭЖХ. Химическая схема разделения при этом такая же. Ускорение процесса достигается за счет большей линейной скорости подвижной фазы и более высокой эффективности.

В качестве детектора используют фотометр видимой области ( $\lambda = 440$  и  $570$  нм), либо флуориметр. Разделенные аминокислоты переводят в производные, используя специальную гидравлическую схему, устанавливаемую между ионообменной колонкой и детектором. С помощью отдельного насоса подают раствор реагента (чаще всего нингидрина), который смешивается с элюатом. Полученная смесь поступает в реактор, который в простейшем случае представляет собой отрезок тефлонового капилляра. Объем реактора, его температура и расход раствора реагента подбирают таким образом, чтобы при минимальном размытии зон примерно за 1 мин реакция аминокислот с нингидрином произошла полностью.

Такая система анализа весьма чувствительна к следам аммиака и аминов в используемых реактивах и воздухе лабораторного помещения, поэтому жидкостная схема анализатора включает в себя специальные поглотительные катионообменные колонки.

Согласно другому методу, производные для флуориметрического или фотометрического детектирования получают до хроматографического разделения. В специальном сосуде или непосредственно в петле дозатора смешивают исследуемый раствор и раствор реагента. После выдержки в течение необходимого времени реакционную смесь вводят в колонку. В качестве реагента чаще всего используют *о*-фталевый альдегид. Надежность работы системы зависит в первую очередь от строгой воспроизводимости условий и продолжительности реакции, поэтому желательно, чтобы она работала автоматически (например, система аминокислотного

анализа фирмы «Уотерс»). Производные аминокислот разделяют обычно методом обращенно-фазовой хроматографии в режиме градиентного элюирования. Применение такой схемы позволяет резко сократить (до 30—40 мин) продолжительность цикла анализа. Высокая эффективность колонки обеспечивает значительное повышение чувствительности. Преимущество приборов, реализующих этот принцип, в том, что они содержат практически все узлы современного жидкостного хроматографа, фактически являясь специализированной версией такового. Поэтому они с легкостью могут быть приспособлены для других работ по ВЭЖХ. К недостаткам данного подхода можно отнести его ограниченную применимость — только для веществ, имеющих первичные аминогруппы.

#### 4.4.3. Разделение энантиомеров

Многие органические соединения, в том числе играющие важнейшую роль в биологических процессах, содержат в своих молекулах асимметрические\* атомы углерода. Такие молекулы способны существовать в виде двух оптических изомеров, или энантиомеров. По физическим и химическим свойствам энантиомеры совершенно идентичны. Различие их проявляется только при взаимодействии энантиомерных молекул с другими молекулами, обладающими оптической изомерией. Таких молекул немало в живых организмах, и поэтому биологическое действие оптических изомеров, одного и того же вещества, как правило, неодинаково. Чаще всего только один из изомеров способен «встраиваться» в биологические макромолекулы, участвовать в биохимических процессах, второй же в биологическом отношении инертен. Однако известны также примеры, когда один из изомеров обладал лекарственным действием, в то время как второй был высокотоксичен. Поэтому анализ энантиомерного состава чрезвычайно важен во всех случаях, когда предполагается взаимодействие исследуемого соединения с биологическими системами.

Все способы хроматографического анализа энантиомеров основаны на взаимодействии разделяемой пары с оптически активным расщепляющим агентом, это взаимодействие может осуществляться до разделения либо непосредственно в хроматографической колонке.

Первый подход основан на химической модификации испытуемого образца с помощью оптически чистого реагента. Обозначив энантиомеры разделяемого соединения  $X$  как  $X_D$  и  $X_L$ , а расщепляющий реагент как  $Y_D$ , взаимодействие изомеров можем изобразить следующей схемой;




---

\* Т. е. связанные с четырьмя различными заместителями.

Продукты реакции  $X_D Y_D$  и  $X_L Y_D$  — диастереомеры — содержат в своих молекулах по два асимметрических атома. Расстояния между отдельными структурными фрагментами в них неодинаковы, поэтому они значительно различаются по многим свойствам, в том числе по хроматографической подвижности в обычных нормально- или обращенно-фазовых системах. Таким образом, по хроматограмме продуктов  $X_D Y_D$  и  $X_L Y_D$  можно судить о первоначальном соотношении изомеров  $X_D$  и  $X_L$  в изучаемой смеси. Естественно, вместо реагента  $Y_D$  может быть использован его антипод  $Y_L$ , важно лишь, чтобы тот и другой обладали достаточной оптической чистотой. Описанный подход часто приводит к успеху, однако нельзя не видеть и его принципиального ограничения — пригодности только для аналитических разделений. При необходимости получения исходных веществ в оптически чистом виде производные  $X Y$  необходимо разложить, что сопряжено с риском рацемизации. В качестве модифицирующих реагентов используют ангидриды и хлорангидриды *N*-трифторацетил-*L*-пролина, (-)-ментилмуравьиной кислоты, производных оптически активной винной кислоты, аминокислот и т. д.

Согласно второму подходу, распознавание оптических изомеров происходит непосредственно в хроматографической колонке за счет образования ими лабильных комплексных соединений с расщепляющим агентом — оптически активной аминокислотой (лигандообменная хроматография). Этот метод получил применение в анализе аминокислот и, в меньшей степени, — других аминов. Существуют различные варианты реализации метода. Например, в качестве сорбента можно использовать алкилсиликагель, а ионы комплексообразователя и расщепляющий агент вводить в подвижную фазу. Согласно другому варианту расщепляющий агент химически связывается с поверхностью силикагелевой либо полистирольной матрицы. Ионы комплексообразователя являются компонентом подвижной фазы и служат в качестве «связующего звена» между сорбентом и сорбатом.

Третий подход основан на специфических межмолекулярных взаимодействиях оптических изомеров с неподвижными фазами, содержащими асимметрические фрагменты. Такие неподвижные фазы получают химической либо ионной, либо сорбционной модификацией силикагеля.

В качестве расщепляющих неподвижных фаз используют белки, производные аминокислот, оптически активные производные мочевины, углеводов. Иногда расщепляющая среда создается за счет спиральной вторичной структуры полимеров.

Число различных сорбентов, предложенных для разделения энантиомеров, довольно велико. Однако ни один из них не является универсальным, так как процесс распознавания сильно зависит от структурного соответствия расщепляющего агента и разделяемых соединений. Поэтому интенсивные поиски в данном направ-

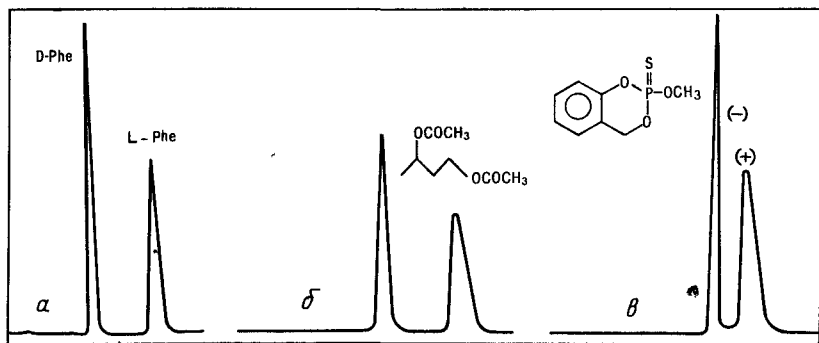


Рис. III.39. Хроматограммы энантимеров.

$\alpha$  — лигандообменное разделение изомеров фенилаланина на колонке Хиралпак Н, подвижная фаза — 0,25 мМ раствор сульфата меди,  $\sigma$  — разделение производного бутандиола 1,3 на колонке Хиралсел ОВ, подвижная фаза — гексан — пропанол 2 (9/1),  $\theta$  — разделение фосфорорганического инсектицида на колонке Хиралпак ОТ, подвижная фаза — метанол

лении продолжают. Многие фирмы уже выпустили колонки для энантиомерного анализа. Наиболее разнообразна номенклатура сорбентов фирмы «Дайсел». Многие из сорбентов способны работать как в нормально-, так и в обращенно-фазовом варианте. Примеры разделения энантимеров на сорбентах этой группы приведены на рис. III.39.

#### 4.4.4. Разделение полимеров

Для хроматографии полимеров могут использоваться обычные нормально- или обращенно-фазовые, либо ионообменные процессы, основанные на связывании разделяемых молекул с поверхностью силами межмолекулярного взаимодействия. Примером такого подхода может служить обращенно-фазовая хроматография белков, позволяющая разделять компоненты, различающиеся балансом гидрофобных и гидрофильных свойств. Закономерности таких разновидностей хроматографии в общем напоминают наблюдаемые при разделении низкомолекулярных веществ. Главной специфической особенностью является использование сорбентов с большим средним диаметром пор — до 50 нм вместо 6—10 нм. В то же время упомянутые виды хроматографии малоселективны по отношению к родственным в химическом отношении полимерам, различающимся молекулярными массами.

Разделение подобного рода осуществимо в режиме эксклюзионной хроматографии. В отличие от других разновидностей хроматографии, в которых скорость перемещения зоны определяется вероятностью адсорбции на поверхности сорбента, в эксклюзионной хроматографии решающим фактором является вероятность диффузии разделяемых молекул вглубь пор непод-

вижной фазы. Процессы адсорбции в этом случае являются паразитарными, поэтому неподвижную и подвижную фазы выбирают таким образом, чтобы свести адсорбцию к минимуму. Термин «сорбент» в этом варианте хроматографии носит, естественно, чисто условный характер.

Основное преимущество эксклюзионной хроматографии — возможность измерения молекулярно-массового распределения в широком диапазоне — от  $10^2$  до  $10^7$  дальтон без градиентного элюирования. При этом положение зон на хроматограмме предсказуемо в зависимости от молекулярной массы.

В упрощенном виде механизм эксклюзионной хроматографии может быть представлен следующим образом. Неподвижная фаза — пористый материал, причем средний размер пор сопоставим с размерами молекул разделяемых веществ. Молекулы смеси в колонке, заполненной таким материалом, будут вести себя по-разному, в зависимости от размеров. Наиболее крупные молекулы, не способные диффундировать внутрь пор неподвижной фазы, могут находиться только в пространстве между частицами и, следовательно, их удерживаемый объем будет равен объему колонки минус суммарный объем частиц неподвижной фазы ( $V_0$ ). Молекулы, размеры которых меньше наиболее мелких пор сорбента, способны диффундировать внутрь частиц, поэтому удерживаются в колонке дольше, чем более крупные молекулы. Объем их элюирования равен полному объему растворителя в колонке, т. е. сумме объема пор и объема между частицами ( $V_t$ ). Молекулы промежуточных размеров, для которых доступна та или иная доля пор сорбента, будут выходить из колонки между объемами  $V_0$  и  $V_t$ . Если ввести в колонку смесь веществ с известными и в достаточной степени различающимися молекулярными массами, из хроматограммы можно получить калибровочную кривую, подобную изображенной на рис. III.40. Следовательно основная сфера применения эксклюзионной хроматографии — фракционирование смесей в соответствии с их молекулярными массами. Калибровочная кривая эксклюзионной хроматографии в своей средней части содержит линейный участок, в котором разделяющая способность колонки и точность измерений максимальны. Эта линейная часть обычно охватывает примерно два порядка молекулярных масс. Рабочий диапазон эксклюзионной колонки зависит от размера пор и смещается в область больших масс при увеличении среднего размера пор сорбента. Поэтому для работы в широком диапазоне масс обычно последовательно соединяют две или более колонок, различающихся по размеру пор.

В эксклюзионной хроматографии особо важное значение имеет подбор сорбента не только с точки зрения его пористости, но и с точки зрения химии поверхности, а также тщательный выбор состава подвижной фазы. Чаще всего применяют материалы двух групп — жесткие и полужесткие. Жесткие сорбенты изготавли-

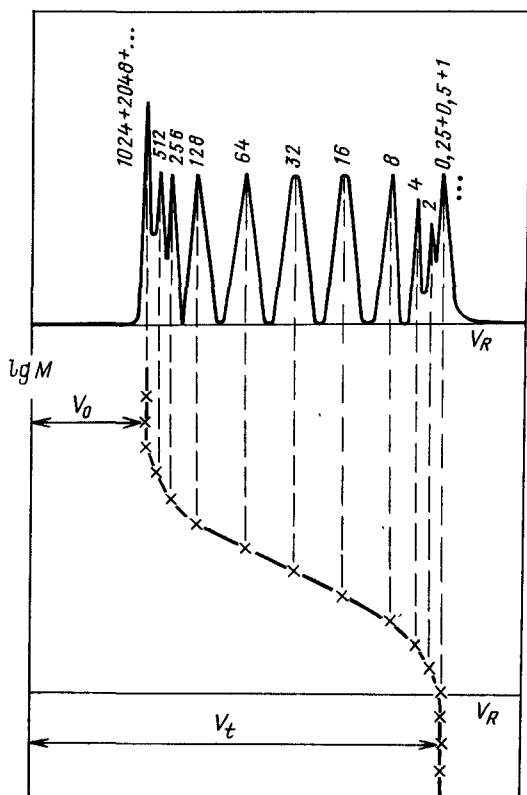


Рис. III.40. Эксклюзионная хроматограмма и соответствующая калибровочная кривая. Цифрами у вершин пиков обозначены молекулярные массы (в условных единицах)

вают на основе силикагелей и реже — пористых стекол. Их достоинства — механическая прочность, устойчивость к любым растворителям с  $pH < 8$ , отсутствие явлений набухания. Их используют для разделения в водных и органических растворителях. Главный недостаток сорбентов этого типа — заметная адсорбционная активность, ограничивающая их применение для разделения биополимеров. Для ее подавления поверхность модифицируют ковалентно (химической прививкой гидрофобных или гидрофильных органических радикалов) либо динамически, т. е. с помощью специальных добавок к подвижной фазе.

Полужесткие сорбенты изготавливают на основе органических сополимеров, они в равной степени способны набухать в различных растворителях. Для работы с органическими подвижными фазами обычно используют стиролдивинилбензолные гели (стирагель и другие), для водных подвижных фаз — полярные сопо-



лимеры (например, оксиэтилметилметакрилат с этилендиметакрилатом). Материалы этой группы адсорбционно значительно менее активны, чем жесткие гели и предпочтительны для эксклюзионной хроматографии биополимеров. Недостатки — трудность замены растворителей без потери эффективности колонки, относительно низкая скорость разделения из-за невысокого предельного давления.

Выбор растворителя определяется свойствами разделяемых веществ, характером сорбента и применяемым детектором. Используемые подвижные фазы должны хорошо растворять образец, смачивать сорбент и подавлять его остаточную адсорбционную способность. Для работы с органическими веществами чаще всего применяют тетрагидрофуран, хлороформ, диметилформамид. При работе с жесткими гелями бывает желательно добавлять в подвижную фазу этиленгликоль и полигликоли для подавления адсорбции.

Анализ биополимеров проводят, как правило, в водных средах [90]. Добавляемые модификаторы (соли, поверхностно-активные вещества, органические растворители) должны обеспечить блокирование всех побочных механизмов удерживания.

Реальные эксклюзионные хроматографы редко представляют собой такую закономерную последовательность пиков, как это изображено на рис. III.40. Поэтому обработка их представляет определенные трудности и неосуществима с помощью обычных интеграторов. Наилучшие результаты дает обсчет эксклюзионных хроматограмм и расчет молекулярно-массовых распределений с помощью ЭВМ. При небольшом числе анализов можно использовать и ручной метод.

Эксклюзионную хроматографию можно также использовать для предварительного фракционирования сложных смесей, оценки содержания полимерных компонентов в смесях и мономеров — в полимерах. В отдельных случаях возможно также разделение смесей низкомолекулярных веществ. Детальный обзор практических аспектов эксклюзионной хроматографии дан в работе [21].

## ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Тонкослойная хроматография (ТСХ) была предложена Н. Л. Измайловым и М. С. Шрайбер в 1938 г. Однако ее широкое использование началось с 1956 г., после того, как Шталь стандартизировал метод, разработал оборудование для его реализации, показал универсальную применимость ТСХ и написал первое руководство по ее практическому использованию.

ТСХ является разновидностью варианта жидкостной хроматографии (ЖХ), в которой разделение веществ происходит на открытом слое адсорбента, т. е. как бы на колонке с частично удаленной передней и задней стенками («планарный» вариант хроматографии).

Представление о классификации методов планарной хроматографии дают данные, представленные на рис. IV.1. Это не только методы, в которых движение элюента происходит под действием капиллярных сил [бумажная (БХ), тонкослойная (ТСХ) и ее разновидность высокоэффективная ТСХ (ВЭТСХ)], но и методы, при которых движение элюента происходит под действием различных приложенных внешних сил. Ко второй группе методов относят: ТСХ под давлением (ТСХД) (ОPLC), разновидностью которой является круговая ТСХ под высоким давлением (КТСХВД), и ТСХ под действием центробежной силы (ротационная ТСХ — РТСХ). Наиболее широко на практике используют ТСХ и ВЭТСХ.

Основные особенности ТСХ определяются движением элюента по слою сорбента за счет капиллярных сил, что предопределяет простоту и легкость проведения хроматографического эксперимента и низкую стоимость оборудования для ТСХ. Применение в большинстве случаев дешевого универсального адсорбента —

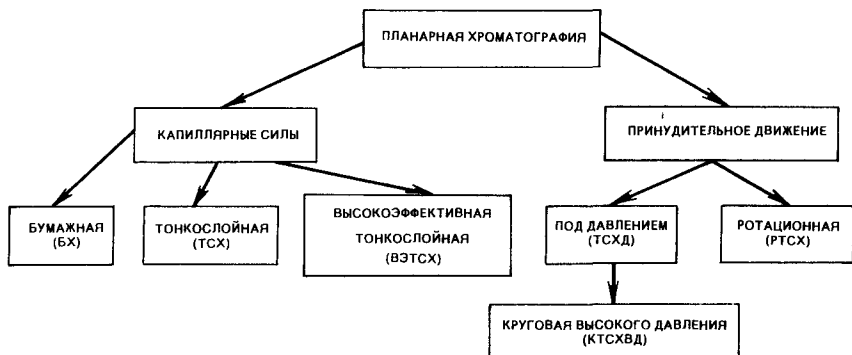


Рис. IV.1. Классификация методов планарной хроматографии

силикагеля позволяет использовать хроматографическую пластинку большей частью лишь однократно. Открытый слой адсорбента обеспечивает легкость нанесения пробы, возможность одновременного анализа большого числа проб, простоту наблюдения за процессом элюирования и интерпретации хроматограмм. При этом возникают широкие возможности селективного детектирования любых компонентов, в том числе содержащих радиоактивные изотопы, и определения всех компонентов пробы, включая необратимо или прочно сорбирующиеся. Открытый слой адсорбента в ТСХ позволяет легко осуществлять рехроматографию (двумерная ТСХ) и градиентные методики (программирование активности адсорбента, рН-градиент слоя, полизональная ТСХ и др.). Для ТСХ характерно малое время анализа (определяется временем движения наиболее быстро движущегося по пластине компонента смеси), возможность контактного фотографирования хроматограмм и т. д.

Операция анализа методом ТСХ включает следующие стадии: 1) подготовку пробы; 2) подготовку пластины; 3) нанесение образцов; 4) подготовку хроматографической камеры; 5) элюцию (проявление, развитие) хроматограммы; 6) удаление элюента с пластины; 7) детектирование (визуализация); 8) идентификацию; 9) количественную оценку; 10) документацию.

ТСХ используют как аналитический и препаративный методы, которые обеспечивают разделение в пределах от  $10^{-3}$  до  $10^{-12}$  г. Особенностью ТСХ является то, что разделенные компоненты в виде пятен на пластинке можно выделять и идентифицировать другими микроаналитическими методами (ГХ, ВЭЖХ, видимой УФ-, ИКС-, ЯМР-спектроскопией, масс-спектрометрией и др.).

Первый вариант ТСХ (согласно Шталю) имел недостатки, преодоление которых позволило в последующем создать высокоэффективную хроматографию — ВЭТСХ [91]. ВЭТСХ представляет собой комплекс методов и средств, которые позволяют реализовать в ТСХ высокую эффективность, чувствительность, скорость, воспроизводимость, пиковую емкость при одномерном разделении и др. ВЭТСХ превращена в инструментальный метод разделения и анализа. Естественно, что это несколько усложняет и удорожает анализ. При выборе метода ТСХ-анализа исследователи исходят из доступности и наличия оборудования, его стоимости и аналитической задачи, которую предстоит решать. Поэтому используют как ТСХ, так и ВЭТСХ, а также сочетание этих методов (отдельные элементы ВЭТСХ и ТСХ).

# ПАРАМЕТРЫ И ОСНОВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗДЕЛЕНИЯ В ТСХ

## 1.1. ПАРАМЕТРЫ ТСХ

ТСХ является планарной разновидностью жидкостной хроматографии, в которой подвижная фаза движется в пористой среде слоя адсорбента. Скорость определяется соотношением времен движения в токе элюента и удерживания за счет сорбции. При этом каждая молекула вещества участвует в многочисленных актах сорбции и десорбции. В конце процесса хроматографирования каждая зона проходит характерное расстояние, определяемое положением центра хроматографической зоны, которая размывается за счет флуктуации средней скорости индивидуальных молекул при движении по слою на пластине.

Таким образом, основным в ТСХ является элютивный процесс независимого движения компонентов по пластине с постепенным размыванием хроматографических зон. В результате тонкослойные хроматограммы имеют вид, изображенный на рис. IV.2, на котором показаны тонкослойные хроматограммы смеси ДНФ — аминокислот на пластинах с силикагелем разного фракционного состава.

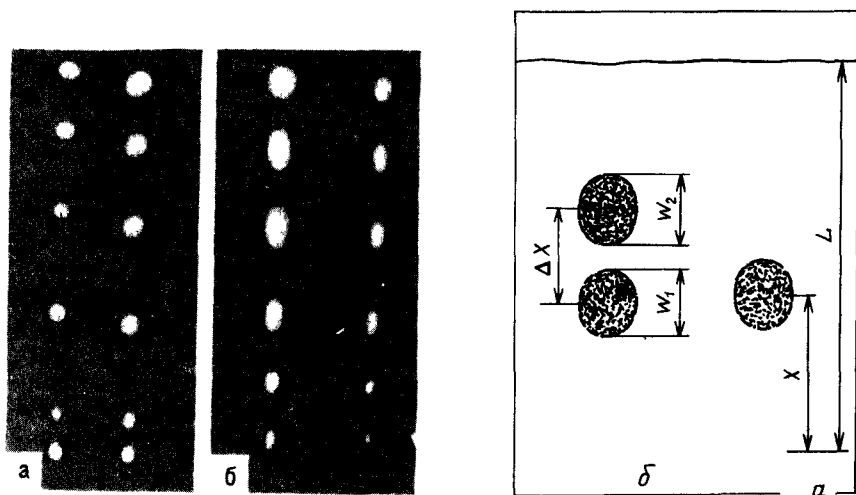


Рис. IV.2. ТСХ смеси ДНФ-аминокислот на пластинах с силикагелем с диаметром зерна:

а — 5 мкм, б — 25 мкм

Рис. IV.3. Определение  $R_f$  (а) и разрешения  $R$  (б) хроматографических зон на пластине

Обе хроматограммы характеризуются постепенным увеличением размеров зон по мере увеличения длины пробега по пластине. При этом на пластине с более крупным силикагелем пятна, находящиеся в средней части пластины, имеют вытянутую эллиптическую форму, которая постепенно переходит в круглую по мере приближения к верхнему краю пластины. На пластине с мелким силикагелем пятна на всем протяжении имеют круглую форму. Эти хроматограммы наглядно демонстрируют двойственный характер механизма размывания зон как за счет факторов, не зависящих от размера частиц сорбента и действующих в продольном и поперечном направлениях, так и за счет факторов, действующих только вдоль направления движения элюента и зависящих от размера частиц, причем сила действия их увеличивается от нижнего и верхнего краев пластины к середине.

В работах Беленького с сотр. [92] было показано, что ТСХ является двумерным неидеальным и неравновесным хроматографическим процессом, который можно описать уравнением, учитывающим распределение вещества в хроматографической зоне при движении со скоростью  $v$  и размыванием зоны вдоль и поперек направления движения элюента. Скорость движения хроматографической зоны  $v$  составляет определенную долю  $R_f$  скорости движения элюента  $u$  и зависит от коэффициента распределения  $K_d$  вещества и соотношения объемов фаз  $V_n/V_n$ :

$$R_f = v/u = 1/1 + (V_n/V_n) K_d. \quad (IV.1)$$

Величина  $R_f$  характеризует подвижность хроматографических зон в ТСХ и определяется экспериментально соотношением расстояния  $X$ , пройденного веществом от точки нанесения пробы до центра зоны (пятна), и расстояния  $L$ , пройденного элюентом от точки нанесения пробы до фронта элюента (рис. IV.3). Величина  $R_f$  находится между 0 и 1:  $1 > R_f > 0$ . При  $R_f = 0$  вещество не движется, остается в точке нанесения (на старте), при  $R_f = 1$  вещество не задерживается неподвижной фазой и движется с фронтом растворителя.

Произведение  $(V_n/V_n) K_d = k'$  представляет собой фактор емкости — соотношение времен нахождения вещества в неподвижной  $t_s$  и подвижной  $t_m$  фазах:

$$k' = t_s/t_m. \quad (IV.2)$$

$k'$  и  $R_f$  связаны соотношением

$$k' = (1 - R_f)/R_f, \quad (IV.3)$$

$$k' = \exp(-\Delta F/RT), \quad (IV.4)$$

где  $\Delta F$  — изменение свободной энергии межфазного перехода;  $R$  — универсальная газовая постоянная;  $T$  — абсолютная температура.

Отсюда

$$-\Delta F/RT = R_m = \lg(1 - R_f)/R_f. \quad (IV.5)$$

Значениям  $k'$  от 1 до 10 соответствуют значения  $R_f$  от 0,09 до 0,5. Кроме величин  $R_f$  и  $R_m$  важными параметрами ТСХ являются эффективность и разрешение.

Эффективность, как и в других вариантах хроматографии, определяется числом теоретических тарелок  $N$  или высотой, эквивалентной теоретической тарелке — ВЭТТ ( $H$ ), по уравнениям:

$$N = 16(X/w)^2 = 16(LR_f/w)^2, \quad (IV.6)$$

где  $w$  — ширина зоны в направлении движения элюента;

$$H = L/N = w^2/16R_fL. \quad (IV.7)$$

Величина  $H$  характеризует размывание хроматографической зоны.

Разрешение  $R$  двух хроматографических зон (пятен) определяется расстоянием между их центрами ( $\Delta X$ ), поделенным на среднеарифметическое из их ширин ( $w_1$ ) и ( $w_2$ ):

$$R = \Delta X / (w_1 + w_2) / 2. \quad (IV.8)$$

На рис. IV.3,б показано определение разрешения двух зон.

Разрешение является функцией трех факторов: коэффициента распределения  $K_d$ , селективности  $\Delta K_d$  и эффективности  $N$ . Разрешение двух зон считается полным при  $R \geq 1,5$ . Для максимального разрешения оптимальным является значение  $R_f \approx 0,3 - 0,5$ .

Оптимизация ТСХ как способа достижения максимальной скорости анализа, его чувствительности и эффективности исследовалась многими авторами. С этой целью использовали зависимость ВЭТТ ( $H$ ) или соответствующих приведенных величин от скорости (уравнение Нокса): приведенная ВЭТТ  $h = H/d_p$ , приведенная скорость  $v = u d_p / D_m$ , где  $D_m$  — коэффициент диффузии хроматографируемого вещества в элюенте. С использованием приведенных величин  $h$  и  $v$  уравнение Нокса приобретает вид:

$$h = (b/v) + a v^{1/3} + c v, \quad (IV.9)$$

где  $a$ ,  $b$ ,  $c$  — безразмерные экспериментальные коэффициенты.

Это уравнение описывает кривую с минимумом, левая (крутая) ветвь которой связана в основном с размыванием за счет молекулярной диффузии, а правая (пологая) ветвь — с размыванием за счет межфазного переноса и профиля скорости в слое адсорбента. Благодаря переменной  $v$  в ТСХ  $h$  также является переменной величиной, причем  $v$  связана с  $L$  зависимостью

$$v = K_0 d_p^2 \lambda \cos \theta / (L \eta D_m), \quad (IV.10)$$

где  $K_0$  — коэффициент гидродинамической проницаемости слоя сорбента;  $\lambda$  — поверхностное натяжение;  $\theta$  — краевой угол смачивания;  $\eta$  — вязкость элюента

При увеличении  $L$  и, следовательно, уменьшении  $v$ ,  $h$  уменьшается, проходит через минимум при  $L = L_{opt}$  и начинает резко расти на левой крутовосходящей ветви зависимости  $h(v)$ . При

этом эффективность пластины  $N$  увеличивается лишь в малой степени, а время анализа резко возрастает. Отсюда делается вывод о необходимости использовать пластину для ТСХ длиной  $L \leq L_{\text{opt}}$ , которая зависит от свойств элюента ( $\lambda$ ,  $\theta$  и  $\eta$ ) и вещества ( $D_m$ ).

Установлено [93], что для обычных элюентов и низкомолекулярных веществ  $L_{\text{opt}} \approx 10$  см и  $d_{p \text{ opt}} \approx 10$  мкм, а для высокомолекулярных веществ  $L_{\text{opt}} \approx 5$  см и  $d_{p \text{ opt}} \approx 5$  мкм.

В работах Гиюшона с сотр. рассматривали ТСХ как одномерную хроматографию с учетом размывания зон с помощью уравнения Нюкса. Кроме того, движение элюента по пластине рассматривалось как процесс, осложненный испарением элюента с поверхности пластины и адсорбцией активного компонента из паров элюента в не полностью насыщенной хроматографической камере. Эффективность пластины  $N$  рассматривалась как функция  $d_p$ , т. е. была продемонстрирована необходимость увеличения диаметра частиц для достижения максимального значения  $N$  (при этом время анализа и хроматографическое размывание возрастают).

Современная высокоэффективная ТСХ (ВЭТСХ) включает комплекс методов и средств для получения максимальной эффективности разделения, минимального времени анализа и максимальной чувствительности детектирования. На ВЭТСХ-пластинах фирмы «Мерк» с диаметром частиц адсорбента 3—8 мкм пробег элюента составляет 2—4 см. Для достижения оптимальных параметров разделения применяют специальные устройства для нанесения проб (с оптимальным размером стартового пятна) и различные методы сжатия зон в направлении движения элюента (круговая и антикруговая ТСХ, многократное хроматографирование и другие), что позволяет увеличить разрешение компонентов (на данном отрезке пластины может разместиться большее число зон).

## 1.2. ОСНОВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗДЕЛЕНИЯ В ТСХ И ВЫБОР ЭЛЮЕНТА

ТСХ является разновидностью ЖХ, поэтому основные механизмы разделения в ЖХ реализуются и в ТСХ (табл. IV.1).

Эта классификация основана на характере сил, действующих между растворенными веществами и твердой или жидкими фазами, с которыми они соприкасаются. На практике обычно разделение веществ протекает по смешанным механизмам. Адсорбционная хроматография сопровождается распределительной при ТСХ на слабоактивных сорбентах в элюентах, содержащих воду. Распределительная и ионообменная хроматография могут сопровождаться адсорбционной. На разделение по адсорбционному механизму может оказывать влияние структура пор адсорбента

Таблица IV.1. Основные механизмы разделения в ЖХ

Вид хроматографии	Принцип взаимодействий	Параметры, контролирующие разделение
Адсорбционная (АХ) нормально-фазовая (НФХ)	Адсорбция	Коэффициенты адсорбции
Распределительная нормальная (РНХ)	Экстракция, межфазное распределение	Коэффициенты распределения
Распределительная обращенно-фазовая (ОФХ)	Экстракция, межфазное распределение, гидрофобные взаимодействия	То же
Ион-парная обращенно-фазовая (ИП ОФХ)	Гидрофобные взаимодействия с установлением вторичного равновесия ион-парных комплексов	Коэффициенты распределения, вторичные константы равновесия
Ионообменная (ИОХ)	Электростатические (ионные) взаимодействия	Заряд, константа диссоциации, изоэлектрические точки
Эксклюзионная гель-проникающая (ГПХ)	Исключение из пор адсорбента	Эффективный размер макромолекул, коэффициент распределения

(влияние ГПХ-механизма), на ГПХ — адсорбционные взаимодействия и т. д. К тому же в ТСХ в отличие от ЖХ все процессы разделения осложняются влиянием паровой фазы. Это может приводить к возникновению тонких взаимодействий между веществом и сорбентом, элюентом и сорбентом и веществом и элюентом, что позволяет получить в ряде случаев разделение близких по структуре веществ и сложных многокомпонентных смесей, которые при реализации чистых механизмов невозможно получить в ЖХ или при использовании, например, ТСХ под давлением.

### 1.2.1. Адсорбционная ТСХ

Адсорбционная ТСХ основана на конкурентном взаимодействии полярных групп вещества и молекул растворителя с активными центрами неподвижной твердой фазы (адсорбента). Неполярная подвижная фаза смешивается с определенным количеством более полярного растворителя (углеводород + спирт), при этом при увеличении концентрации полярного компонента увеличивается ( $R_f$ ). Подвижность разделяемых веществ растет, так как они вытесняются с активных центров адсорбента в результате конкуренции с элюентом. Определенный вклад вносит также взаимодействие разделяемых веществ с элюентом. Для элюирования неполярных веществ используют неполярные подвижные фазы, в которых они элюируются раньше, чем полярные вещества. Так как сорбенты содержат различные функциональные группы с различным распределением их по поверхности, разделяемые компоненты обычно представляют собой сложные



вещества с различными функциональными группами, а в качестве элюентов используют смеси растворителей, то предсказать, какой тип взаимодействия окажется решающим и приведет к разделению данной смеси веществ, весьма сложно.

Какие же существуют общие подходы к подбору элюентов в ТСХ? В литературе обобщен большой опыт разделения разных классов соединений методом ТСХ [94, 95]. Поэтому, если исследователь имеет дело с разделением веществ, описанных в литературе, то следует воспользоваться известными для этих целей элюентами, и, изменяя их состав, регулировать  $R_f$  с учетом типа используемых пластин и способа ТСХ. Для разделения веществ с известной химической структурой, для которых метод ТСХ не использовали, существуют лишь очень общие подходы, основанные, например, на использовании корреляционной теории Снайдера или теории межмолекулярных взаимодействий Киселева.

Может быть приведена полуколичественная оценка способности наиболее распространенных функциональных групп (разделяемые вещества), неподвижных фаз (сорбентов) и растворителей к образованию различных типов связей (образование Н-связи, взаимодействие диполей, дисперсионные, координационные и ионные силы взаимодействия). Однако, так как элюирующая способность растворителя определяется суммой всех сил его взаимодействия с хроматографируемым веществом, которые могут действовать в противоположных направлениях, то принцип элюотропных рядов, или относительной полярности функциональных групп (разделяемых веществ), дает лишь ориентировочную информацию. Элюент, используемый для разделения веществ, характеризуется селективностью и элюирующей силой. В табл. IV.2 приведены наиболее часто применяемые растворители.

Таблица IV.2 Элюирующая сила различных растворителей

№ группы	Растворители	Элюирующая сила	№ группы	Растворители	Элюирующая сила
I	n-Гексан	0	V	Дихлорметан*	3,1
	n-Бутиловый эфир	2,1		1,1-Дихлорэтан	3,5
	Диизопропиловый эфир	2,4	VI	Этилацетат*	4,4
	Метил-трет-бутиловый эфир	2,7		Метилэтилкетон	4,7
	Диэтиловый эфир*	2,8		Диоксан*	4,8
II	n-Бутанол	3,9		Ацетон	5,1
	Изопропанол*	3,9	VII	Ацетонитрил	5,8
	n-Пропанол	4,0		Толуол	2,4
	Этанол*	4,3		Бензол*	2,7
	Метанол	5,1	VIII	Нитробензол	4,4
III	Тетрагидрофуран*	4,0		Хлороформ*	4,1
	Пиридин	5,3		Нитрометан	6,0
	Метоксиэтанол	5,5		Вода	10,2
IV	Диметилформамид	6,4			
	Уксусная кислота*	6,0			
	Формамид	9,6			

Общий подход к подбору элюентов в ТСХ предложил Ниреди с сотр. на основе модели призмы (трехмерная модель), где элюирующая сила растворителя коррелирует с его селективностью [96]

### **1.2.2. Распределительная ТСХ (нормальная и обращенно-фазовая)**

Для реализации распределительной ТСХ в нормальном варианте используют неподвижные полярные фазы (вода, уравновешенная с органическими растворителями) и подвижные неполярные фазы (органический растворитель, уравновешенный с водой), между которыми распределяются хроматографируемые вещества. Разделяемые вещества должны быть более растворимы в неподвижной фазе. Для этого механизма разделения характерным является увеличение удерживания с увеличением полярности вещества и уменьшение с увеличением полярности элюента.

Распределительная ТСХ может быть реализована на обычных адсорбентах (например, силикагель, целлюлоза, кизельгур), сорбентах, импрегнированных полярными соединениями (этиленгликоль, ДМФА, ДМСО), сорбентах, импрегнированных гидрофобными веществами (ундекан, парафиновое, силиконовое масло, тетрадекан), гидрофильных сорбентах с химически связанными фазами (диол-, циан-, amino-фазы) и гидрофобных сорбентах с химически связанными фазами ( $C_2$ -,  $C_8$ -,  $C_{18}$ -фазы).

ТСХ-пластины для распределительной ТСХ с химически связанными фазами имеют преимущества перед импрегнированными: не требуется насыщения элюента неподвижной фазой, разделяемые вещества не загрязняются неподвижной фазой, характеризуются более воспроизводимыми величинами  $R_f$ , меньше влияют на результаты остаточные силанольные группы. Пластины для ТСХ с диольной химически связанной фазой по хроматографическим свойствам близки к пластинам с немодифицированным силикагелем. Однако адсорбционная активность гидроксидов, а следовательно, и удерживание на диольных пластинах слабее. Элюенты для ТСХ на диольных и обычных силикагелевых пластинах близки по составу. Это обычно органические растворители с добавками кислот или оснований. Пластины для ТСХ с нитрильными группами в зависимости от используемых элюентов могут быть применены как для прямофазной, так и для обращенно-фазовой с разным порядком элюирования разделяемых соединений. Эти сорбенты могут также применяться для ион-парной хроматографии. ТСХ-пластины с аминогруппами являются слабо-основным ионообменником. Эти пластины можно применять для разделения веществ с разными суммарными зарядами ионизированных групп и различающихся гидрофобностью заместителей

в молекуле (вещества с различной полярностью). Благодаря полярности аминогруппы эти пластины могут применяться и для прямофазной ТСХ с использованием неводных элюентов.

Для обращенно-фазовой ТСХ применяют пластины с алкилмодифицированными силикагелями:  $RP_2$ ,  $RP_8$  и  $RP_{18}$  с привитыми углеводородными неполярными фазами. В качестве элюентов используют смеси полярных растворителей: спирты, ацетонитрил, ацетон, диоксан, эфир, смешанные с водой в разных соотношениях. Вещества элюируются в порядке увеличения полярности (более полярные — быстрее). Сила элюента увеличивается с уменьшением полярности. Чем больше элюирующая сила ( $P$ ), тем растворитель — более слабый элюент. Механизм разделения основан как на гидрофобных силах, вытесняющих неполярное вещество из водного элюента, так и на ван-дер-ваальсовых взаимодействиях углеродной части молекулы разделяемых соединений и алкильных радикалов адсорбента. С увеличением длины алкильного радикала взаимодействие увеличивается.

Обращенно-фазовую ТСХ применяют для разделения полярных (на немодифицированных силикагелях возможна необратимая сорбция) и неполярных соединений (удерживаются сильнее при увеличении длины цепи). Наиболее широко в качестве элюентов используют смеси метанол — вода или ацетонитрил — вода. При увеличении полярности вещества для уменьшения удерживания увеличивают содержание воды в элюенте. Однако при увеличении содержания воды более 35% сильно замедляется движение элюента, и пластины перестают смачиваться. Добавление солей ( $NaCl$ ,  $LiCl$ ) в элюент улучшает смачивание. Используются и гидрофобные растворители (метиленхлорид и др.). Для разделения кислот, так же как и на немодифицированном силикагеле, в элюент добавляют небольшие количества слабых кислот (уксусная кислота) для обеспечения значения  $pH$  элюента меньше, чем  $pH$  разделяемых кислот. Пластины используют также для ион-парной ТСХ с добавкой в элюент противоионов (гидрофобных солей).

В табл. IV.3 даны некоторые примеры применения в ТСХ химически модифицированных пластин для разделения разных классов соединений.

Таблица IV.3 Пластины и элюенты, применяемые в обращенно-фазовой ТСХ некоторых соединений [97]

Тип пластин	Вещества	Элюенты
Диол-	Гликозиды наперстянки	Этилацетат — 25%-й аммиак (100:1)
	Прогривозачаточные шарики	Петролейный эфир (40—60 °C) — ацетон (8:2)
	Обезболивающие средства	Диизопропиловый эфир — ледяная уксусная кислота (100:1)

Тип пластин	Вещества	Элюенты
Нитрил-	Прогестероны	Петролейный бензин (40—60 °С) — ацетон (8:2) — АТСХ; ацетон — вода (6:4) — ОФТСХ
	ФТГ-аминокислоты	Метанол— <i>n</i> -пропанол—вода (35:25:5) + 0,1 М LiCl
	Консерванты	Этанол — ацетон — вода (2:8:1) + + 0,1 М тетраэтиламмонийхлорид
Амино-	Олигонуклеотиды	Этанол — вода (6:4) + 0,2 М LiCl
RP 2	Алкалоиды спорыньи	Хлороформ — метанол (100:4)
	Пиримидиновые производные	Метанол — вода (7:3), pH 4
	Стероидные гормоны	Ацетонитрил, тетрагидрофуран, ацетон, диоксан с водой (1:1)
RP 8	Афлатоксин М в молоке	Метанол — вода (20:1); (8:2)
	Эфиры фталевых кислот, хлоранилины, ПАУ	Метанол — вода, ацетонитрил — вода
	Антиоксидант в молоке, алкилпиридины, ПАУ	Ацетонитрил, метанол
RP 18	Алкалоиды	Метанол — 0,5 М NaCl (65:35)
	Ароматические кислоты	Ацетонитрил — 0,5 М NaCl (2:8)
	ДНС-аминокислоты	Метанол — 2%-я уксусная кислота (75:25)
	Пенициллины	Метанол — 0,1 М K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (55:45), pH 8,8

## Глава 2

## АДСОРБЕНТЫ И ПЛАСТИНЫ

В качестве адсорбентов для приготовления пластин для ТСХ используют: силикагель, силикагель, модифицированный алкильными и другими группами, оксид алюминия, целлюлозу и модифицированную целлюлозу, силикат магния, ионообменные смолы, полиамид, а также смеси этих и других сорбентов.

Большинство экспериментов в области ТСХ проводят на готовых пластинах, выпускаемых различными фирмами.

Пластины для ТСХ состоят из трех элементов: подложка, слой адсорбента и связующее. В качестве подложки используют стеклянные пластины, алюминиевую фольгу и полимерные пленки (главным образом полиэтилентерефталатные). Наиболее распространенными связующими являются гипс, крахмал, силикаты щелочных металлов и органические полимерные связующие. К адсорбенту часто добавляют люминесцентный индикатор для детектирования веществ, поглощающих в УФ-области спектра. Наибольшее распространение получили пластинки фирм «Мерк» (ФРГ), «Машерей и Нагел» (ФРГ) и «Ватман» (Англия, США). В СССР до недавнего времени наиболее широко использовали пластины силуфол («Кавалиер», ЧСФР).

Силикагель является универсальным и наиболее распространенным адсорбентом для нормально-фазовой ТСХ, и на нем можно разделять органические и неорганические вещества, включая высокомолекулярные соединения.

В табл. IV.4 приведены физические свойства силикагелей и тип связующих веществ для пластин, наиболее часто используемых в ТСХ. Для распределительной и обращенно-фазовой ТСХ широкое распространение получили пластины с модифицированными силикагелями, которые можно расположить в следующий ряд по уменьшению полярности адсорбента: немодифицированный силикагель > модифицированный силикагель с амино- > циано- > диол- > RP-2 > RP-8 > RP-18-группами.

В табл. IV.5 приведены характеристики пластин с модифицированными силикагелями.

Ряд фирм выпускает двухфазные пластины, покрытые двумя адсорбентами. К ним относят в первую очередь пластины с зоной для концентрирования проб, у которых полоса шириной 2—2,5 см покрыта адсорбционно-неактивным адсорбентом (обычно силикагель с диаметром пор 500 нм или диатомит), так называемый преадсорбционный слой, а остальная часть пластины — обычным силикагелем. Такие пластины находят широкое применение в биохимии, клинической химии, для контроля качества

Таблица IV.4. Характеристики силикагелей для ТСХ

Характеристики	«Мерк», ФРГ		«Ватман», США	«Машерей и Нагел», ФРГ
	TLC Si-60	HPTLC-Si 60	LK5 HP-K	SiLG 25

Диаметр пор, нм	6	6	8	6
Объем пор, мл/г	0,82	0,82	0,70	0,75
Удельная поверхность, м <sup>2</sup> /г	550	550	300	500
Фракционный состав, мкм	5—20	5—10	5—10	5—25
Толщина слоя, мкм	250	200	200	250
Связующие	Органическое полимерное (конкретно не указано)			Гипс

Характеристики	«Кавалиер», ЧСФР	«Реахром»	ПКБ ПЛАСТМАШ (Sorbint), Р/к «Ляэне Калур», СССР	
	Силуфол	Реахром	АТСХ	ВЭТСХ

Диаметр пор, нм	6	6	120—150	120—150
Объем пор, мл/г	0,8	0,8	0,8	0,8
Удельная поверхность, м <sup>2</sup> /г	500	300	350	350
Фракционный состав, мкм	5—40	10—20	5—20	8—12
Толщина слоя, мкм	100	100	130 ± 10	130 ± 10
Связующие	Крахмал	Силиказоль		

Таблица IV.5. Модифицированные пластины для ТСХ

Фирма производитель, страна	Обозначение пластин	Модифицирующая функциональная группа	Диаметр частиц, мкм	Примечание
«Мерк», ФРГ	TLC RP-2	C-2	11—13	Неполное силанизиро- вание
	TLC RP-8	C-8	11—13	
	TLC RP-18	C-18	11—13	
	HPTLC RP-2	C-2	5—7	
	RP-8	C-8	5—7	
	RP-18	C-18	5—7	
	-NH <sub>2</sub>	γ-Аминопро- пил-циано	5—7	С повышенной смачи- ваемостью
	-CN	-диол	5—7	
	RP-2, RP-8, RP-18, RP-18(S)	C-2, C-8, C-18	5—7	
«Машерей и Нагел», ФРГ	SILC 18—100	C-18	5—10	Степень силанизирова- ния 100, 75, 50%
	SILC 18—75	C-18	5—10	
	SILC 18—50	C-18	5—10	
«Ватман», США	K C-2	C-2	10—14	Полное силанизирова- ние (end-capped C-2)
	K C-8	C-8	10—14	
	K C-18	C-18	10—14	
	Multi	C-18	10—14	Двухфазные (C-18/си- ликагель)
	K CS 5 -дифенил	Дифенилме- тил	10—14	

фармацевтических препаратов. У ТСХ-пластин указанного типа качество разделения практически не зависит от размера стартового пятна, объема и количества нанесенной пробы вещества, так как нанесенные зоны концентрируются в виде узких полос на границе адсорбентов и далее хроматографируются в виде пятен малого продольного размера. Это повышает эффективность разделения, экономит время, позволяет предварительно очищать образцы в зоне неактивного адсорбента. Двухфазные пластины позволяют концентрировать очень разбавленные пробы при многократном погружении их в раствор образца с использованием элюента, в котором разделяемые вещества в активной зоне пластины имеют  $R_f = 0$ .

В частности, фирма «Мерк» выпускает три разновидности пластин с зоной концентрирования: обычные, высокоэффективные и для препаративной ТСХ.

В двухфазных пластинах другого типа (фирма «Ватман») полоса шириной 3 см (2 см — для ВЭТСХ) покрыта силикагелем, модифицированным фазой RP-18, а остальная часть пластины — обычным силикагелем. На таких пластинах можно реализовать двумерную ТСХ сложных многокомпонентных смесей с разделением компонентов в обоих направлениях по разным механизмам (адсорбционная и ОФТСХ).

Предложена двухпластиночная («grafting») ТСХ-система для этих целей, когда разделение проводят сначала на одной пластине в одном направлении, а затем пластины соединяют таким образом, чтобы при хроматографировании во втором направлении вещества переходили на другую пластину, после чего осуществляется хроматографирование в другом направлении с использованием иного механизма межмолекулярных взаимодействий. Преимущество этой системы заключается в возможности переноса вещества с одной пластины на другую для дальнейшего анализа без извлечения, элюции и повторного нанесения.

Ведущие фирмы в области ТСХ выпускают также готовые пластины с оксидом алюминия, целлюлозой, смесью разных сорбентов и др.

В СССР в ПКБ ПЛАСТМАШ (г. Краснодар) и в р/к «Ляэне Калур» (ЭССР) производят пластины для аналитической и высокоэффективной ТСХ (АТСХ и ВЭТСХ) по технологии, разработанной в Институте высокомолекулярных соединений АН СССР; пластины «Реахром» выпускаются в Арм. ССР. Основные их характеристики представлены в табл. IV.4. Пластины приготовлены с использованием силиказоля в качестве связующего, который при нагревании превращается в силикагель. Эти пластины отличаются высокой механической прочностью и химической стойкостью, они предназначены для многократного использования, так как их можно регенерировать хромовой смесью с последующей отмывкой водой, для детектирования можно использовать коррозионно-активные реагенты (концентрированные кислоты). Аналогичные свойства имеют и так называемые пластины с перманентным покрытием («sintered» TLC plates), в которых адсорбент спекается (отжиг при высоких температурах) со стеклянной подложкой при помощи стеклянного порошка (боросиликатный, известково-натриевый и др.). Однако эти пластины более адсорбционно-активны по сравнению с обычными пластинами со слоем того же сорбента. Кроме того, для их изготовления требуется специальная достаточно сложная технология. Кварцевые стержни с «перманентным покрытием» используют в приборе для количественной ТСХ с пламенно-ионизационным детектором («Iatroscan»). При приготовлении стержней в качестве связующего применяют специальное стекло, которое обеспечивает низкий фон сигнала детектора. Такие стержни могут быть использованы многократно после прожигания в пламени детектора.

Широкие перспективы для сложных анализов открывает возможность модификации готовых пластин самими исследователями с помощью химических реакций, или путем импрегнирования их инертными веществами и реагентами, а также путем облучения в плазме.

Наиболее часто используют силанизирование пластин с силикагелем при погружении в растворы силанизирующих агентов

(диметилдихлорсилан, гексаметилдисилазан и др.). Предложена также обработка готовых пластин различными модификаторами в плазме тлеющего разряда. Модифицированные пластины могут быть использованы для разделения полярных компонентов смесей, сильно взаимодействующих с исходным, немодифицированным силикагелем.

Импрегнирование пластин можно проводить опрыскиванием, погружением или пропитыванием при движении по пластине раствора реагента в соответствующем растворителе. В качестве импрегирующих реагентов применяют борную кислоту, нитрат серебра, ионы Zn, Cd, Mn и другие, пикриновую кислоту, тринитробензол и другие вещества, которые образуют комплексы или производные с компонентами разделяемой смеси.

Стабильные гидрофильные стационарные фазы получают при импрегнировании пластин с силикагелем формамидом, диметилформамидом, этиленгликолем, полиэтиленгликолем и различными буферами. Гидрофобные пластины для ОФТСХ можно получить нанесением ундекана, силиконовых масел, жидких парафинов и др.

Для модификации физическими и химическими методами особенно хорошо подходят пластины с силиказолевым связующим вследствие их химической и механической стойкости.

Для ионообменной ТСХ ряд фирм выпускают пластины, покрытые катионо- и анионообменными смолами на полимерной подложке [Chromatronix, Fixion (ВНР)]. Их применяют для разделения аминокислот, оснований нуклеиновых кислот, нуклеотидов, пептидов и других соединений, образующих при растворении ионные формы.

В табл. IV.6 приведены характеристики пластин для ионообменной ТСХ типа «Fixion».

Для ионообменной ТСХ используют также пластины с производными целлюлозы типа карбоксиметилдиэтиламиноэтилцеллюлоза.

Для лигандообменной ТСХ фирма «Машерей и Нагел» выпускает так называемые хиральные пластины. Стекланная подложка покрыта силикагелем, импрегнированным хиральным агентом (производное пролина) и ионами двухвалентной меди. Эти плас-

Таблица IV.6 Характеристики пластин для ионообменной ТСХ

Тип	Свойства	Функциональная группа	Противоион
Fixion 50×8	Сильнокислый катионообменник	$-\text{SO}_3^-$ $\text{CH}_3$	$\text{Na}^+$
Fixion 2×8	Сильнокислый анионообменник	$-\text{H}_2\text{C}-\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ $\quad\quad\quad $ $\quad\quad\quad\text{CH}_3$	$\text{CH}_3\text{COO}^-$



тины применяют для разделения рацематов и контроля оптической чистоты аминокислот и их галогенированных, N-метилированных, N-формилированных и  $\alpha$ -алкиламинопроизводных, лактонов, дипептидов, тиазолидин-производных карбоновых кислот, а также фармацевтических препаратов.

Пластины на полиамидных пленках обладают существенными особенностями. Переход от фиксированных на подложке гранулированных сорбентов к пористым мембранам позволяет за счет увеличения гидравлической проницаемости хроматографического слоя и его большей регулярности значительно повысить скорость и чувствительность анализа в ТСХ. Ряд фирм («Шляйхер и Шуль», «Пирс», «Машерей и Нагел» и др.) выпускают полиамидные пластины (полиэтилентерефталатные пленки, покрытые с двух сторон пористым слоем полиамида), приготовленные по методу Ванга. Толщина слоя полиамида составляет 50 мкм. Такие пластины можно использовать многократно после промывки полярным растворителем. ТСХ на полиамидных слоях широко применяют в анализе биохимических объектов, фенолов, производных аминокислот, гетероциклических соединений, кислот и др.

Перед нанесением проб пластины иногда подвергают обработке. Наиболее широко применяют активацию пластин для адсорбционной ТСХ путем нагревания в термостате при 110—120 °С в течение 15—30 мин для удаления влаги. Следует, однако, помнить, что пребывание пластин на воздухе после активации в течение короткого времени (в зависимости от температуры воздуха и влажности в помещении) может привести к ее полной дезактивации. Поэтому рекомендуется после активации пластины слой сразу же закрывать стеклянной пластинкой, помещенной несколько выше линии старта (линия нанесения проб).

Для обращенно-фазовой ТСХ подобная активация не требуется. При ионообменной ТСХ пластины предварительно уравнивают элюирующим буферным раствором.

Важной процедурой является предварительная очистка слоя, например, путем элюирования полярным растворителем или обработкой хромовой смесью с последующей отмывкой водой (для пластин с силикагелевым связующим). Пластины для ОФТСХ очищают метанолом.

В зависимости от решаемой задачи перед нанесением проб проводят модификацию пластин различными реагентами для улучшения разделения, последующего селективного детектирования и др.

## НАНЕСЕНИЕ ПРОБЫ. СПОСОБЫ ПРОВЕДЕНИЯ ТСХ

Подготовка пробы является очень ответственной операцией в ТСХ. Выделение вещества для анализа из объекта исследования (из биологических жидкостей, объектов окружающей среды и других) подробно описано в конкретных работах по ТСХ разных классов соединений. Мы остановимся лишь на требованиях, предъявляемых при подготовке пробы, которая непосредственно наносится на ТСХ-пластину.

Понятие экстраколлоидное размывание, используемое в жидкостной хроматографии, также применимо и к ТСХ, где размывание в первую очередь связано с качеством нанесения стартовой зоны образца.

### 3.1. ВЫБОР РАСТВОРИТЕЛЯ И СПОСОБЫ НАНЕСЕНИЯ ПРОБЫ

К растворителю, из которого пробу наносят на слой сорбента, предъявляют следующие требования: полная растворимость в нем всех компонентов пробы; относительная летучесть (для быстрого удаления с пластины перед началом разделения); низкое значение  $R_f$  (при использовании полярных растворителей, в которых  $R_f$  разделяемых веществ близко к 1, пробы хроматографируются непосредственно при нанесении, что искажает форму стартового пятна и может влиять на  $R_f$ , особенно при ТСХ в менее полярных элюентах); хорошая смачиваемость слоя (важно для ОФТСХ).

Стартовая зона должна быть по возможности минимальной, в особенности для ВЭТСХ. Однако в литературе отмечается, что даже для ВЭТСХ можно ограничиться диаметром стартового пятна приблизительно 1,0 мм. Не следует забывать, что слишком высокая концентрация вещества в стартовом пятне может замедлить растворение пробы при элюировании.

Для нанесения проб используют стеклянные платино-иридиевые капилляры, микропипетки, шприцы, а также специальные дозирующие устройства. В ВЭТСХ для дозирования нанолитровых объемов были разработаны самозаполняющиеся платино-иридиевые капилляры с максимальным объемом дозирования 22 нл на 1 м длины. При отборе одной и той же пробы подобным капилляром воспроизводимость введения пробы составляет  $\pm 0,7\%$  от ее объема.

Для нанесения проб фирма «Камаг» выпускает автоматизированные устройства «Наномат» (нанесение стартовых зон в виде точек) и «Линомат» (нанесение стартовых зон в виде полос). Эти устройства пригодны для нанесения проб как в обычной ТСХ, так и в ВЭТСХ. Нанесение больших объемов разбавленных растворов, небольших объемов концентрированных растворов или

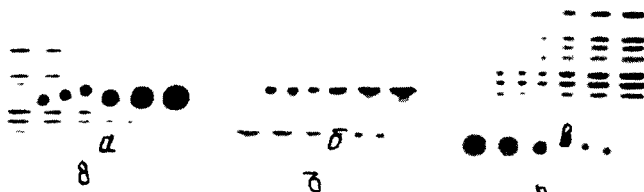


Рис. IV.4 ТСХ смеси красителей на двухфазных пластинах с преадсорбционным слоем фирмы «Мерк» (ФРГ):

а — после нанесения проб,  
б — после элюции до границы слоев, в — после ТСХ

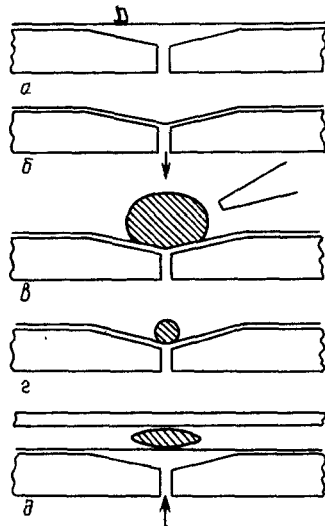


Рис. IV.5. Последовательность операций при нанесении образца контактным способом

проб из вязких растворителей создает определенные трудности, которые можно преодолевать разными способами. При нанесении таких проб можно нагревать пластины или подсушивать их феном для непрерывного испарения растворителя. Использование двухфазных пластин с преадсорбционным слоем снимает многие перечисленные выше проблемы. На границе двух сорбентов зона сжимается в виде узкой полосы независимо от качества нанесения стартового пятна (рис. IV.4).

Пробу можно сконцентрировать в узкую стартовую зону при погружении пластины в растворитель, для которого значения  $R_f$  всех компонентов близки к 1, и пропусканием его несколько выше зоны нанесения пробы, после чего элюирование прекращают, а пластину быстро высушивают. Подобную операцию повторяют несколько раз. Для вязких и разбавленных проб эффективен способ контактного нанесения. На рис. IV.5 показана последовательность операций нанесения пробы по этому методу:

а) над отверстием в металлической пластине помещают смоченную перфторкеросином этиленпропиленовую пленку, которая не смачивается никакими растворителями;

б) с помощью вакуумирования пленка плотно прижимается к пластине и слегка втягивается в отверстие, образуя углубление;

в) в углубление вносят пробу, которая остается там в виде шарообразной капли, так как не смачивает пленку;

г) растворитель испаряют, подсушивая сверху феном, пока шарик не уменьшится до нужного размера;

д) пластину помещают слоем вниз на пленку над пробой и, заменяя вакуум легким давлением, переносят на нее пробу.

Этот метод позволяет нанести на пластину одновременно несколько образцов без их предварительного растворения (биологические жидкости) и концентрировать разбавленные пробы.

При нанесении проб на пластину для получения воспроизводимых результатов необходимо соблюдать ряд требований. Существенным является постоянство расстояния линии нанесения проб от нижнего края пластины (обычно 1,0—2,0 см) и линии погружения пластины в элюент ( $\approx 0,5$  см).

Для сохранения активности слоя адсорбента рекомендуется во время нанесения проб покрывать адсорбент выше линии нанесения стеклянной пластиной, наносить пробу по возможности быстро и тщательно высушивать перед хроматографированием. Рекомендуется для лучшего высушивания пробы на пластине наносить на нее равный объем этанола и снова высушивать. Осушку пробы можно проводить и перед нанесением на пластину, добавляя водоотнимающее средство. При высушивании или нанесении на активный сорбент проба может разлагаться, необратимо осаждаться, возможна низкая растворимость образцов.

При подготовке пробы необходимо использовать чистые растворители, так как примеси в растворителях при концентрировании пробы также концентрируются и в дальнейшем могут искажать результаты ТСХ.

## 3.2. СПОСОБЫ ПРОВЕДЕНИЯ ТСХ

### 3.2.1. Линейная, круговая и антикруговая ТСХ

В колоночной жидкостной хроматографии возможно только линейное движение элюента. В ТСХ благодаря открытому слою сорбента можно осуществить три типа элюирования: линейное, круговое и антикруговое (рис. IV.6). Кроме того, в ТСХ можно реализовать дополнительно различные методики, позволяющие значительно увеличивать пиковую емкость.

Наиболее широко используют линейное развитие хроматограмм. Пробы наносят на стартовую линию параллельно одной из сторон пластины. Пластину помещают вертикально в хроматографическую камеру, на дно которой налит элюент, и проводят восходящую ТСХ. В линейной ТСХ с увеличением  $R_f$  вещества размывание увеличивается. Линейное развитие хроматограмм можно осуществить и при горизонтальном положении пластины

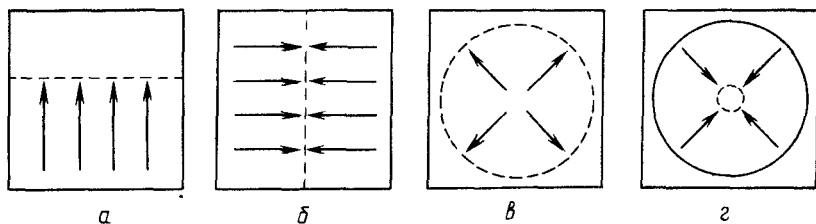


Рис. IV.6. Типы элюирования в ТСХ:

а — линейное, б — линейное (горизонтальное), в — круговое, з — антикруговое

с подачей на нее элюента с одной или с обеих сторон (рис. IV.6, б). Для восходящей линейной ТСХ в качестве хроматографической камеры можно использовать любой сосуд прямоугольной или цилиндрической формы. Однако в таких камерах трудно получить воспроизводимые результаты, так как по мере поднятия элюента по пластине происходят фронтальное разделение элюента в слое сорбента (полизональная ТСХ), адсорбция и капиллярная конденсация компонентов элюента из паровой фазы на сухую часть пластины и другие процессы (рис. IV.7). Регулировать эти процессы сложно. В подобных камерах можно проводить ТСХ с насыщением (стенки камеры покрывают фильтровальной бумагой, смоченной элюентом, что стабилизирует условия разделения) или без насыщения.

Фирма «Камаг» выпускает для ТСХ двойные («twin») камеры, в которых можно осуществлять три варианта хроматографии: без насыщения, с предварительным насыщением и с насыщением в процессе хроматографии (рис. IV.8). Расход элюента в этих камерах значительно меньше.

Для уменьшения влияния паровой фазы в линейной ТСХ используют «сэндвич»-пластины. С трех сторон двух пластин снимают узкий слой сорбента и, проложив между ними прокладку (толщина 0,5—2 мм), плотно скрепляют такой «сэндвич» зажимом и опускают в камеру с элюентом. ТСХ проводят таким образом одновременно на двух пластинах, расположенных слоем друг к другу. В качестве второй пластины можно использовать стеклянную подложку без слоя адсорбента. На «сэндвич»-пластинах реализуется естественный градиент за счет испарения более летучего компонента элюента при его движении по пластине, что приводит к сжатию зон.

В круговой ТСХ пробы наносят на некотором расстоянии от центра пластины по окружности, а элюент подают в центр (см. рис. IV.6, в). Оптимальное разрешение достигается круговой хроматографией при  $K' = 100$  ( $R_f = 0,009$ ), т. е. хорошо разделяются вещества с низкими значениями  $R_f$ . При этом у старта пятна симметричные и компактные, а ближе к фронту сжимаются в направлении элюирования и вытягиваются по окружности.

В антикруговой ТСХ пробы наносят по окружности по периферии пластины и элюент подают в направлении к центру пластины (см. рис. IV.6, з). При этом хроматографические зоны сжимаются по мере движения по пластине. В антикруговой ТСХ одновременно можно анализировать наибольшее количество проб. Это наиболее быстрый метод ТСХ. Антикруговая ТСХ дает хорошие результаты при разделении веществ с высокими значениями  $R_f$  (оптимальное разрешение при  $K' = 1$ ,  $R_f \approx 0,5$ ). Соотношения  $R_f$  в линейной, круговой и антикруговой ТСХ представлены уравнениями:

$$R_{f \text{ мин}} = [R_{f \text{ кр}}]^2, \quad (\text{IV.11})$$

$$R_{f \text{ мин}} = 1 - [1 - (R_{f \text{ акр}})] \quad (\text{IV.12})$$

Для реализации круговой и антикруговой ТСХ фирма «Камаг» выпускает специальные так называемые U-камеры (рис. IV.9). Применение U-камер позволяет повысить воспроизводимость результатов ТСХ за счет элиминирования влияния паровой фазы (элюент вынесен за пределы камеры) и возможности проведения ТСХ в атмосфере инертного газа. Кроме того, имеется возможность наносить пробу в поток элюента. Круговую и антикруговую ТСХ можно реализовать и более простым способом при использовании, например, чашки Петри для круговой ТСХ и двух чашек Петри, вставленных одна в другую для антикруговой ТСХ.

Элементы круговой и антикруговой ТСХ могут быть реализованы и в вертикальном варианте в обычных камерах. Это ТСХ по

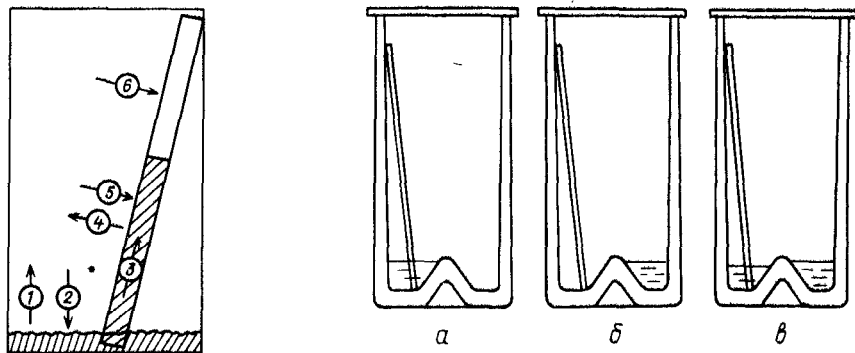


Рис. IV.7. Процессы переноса элюента при ТСХ в нормальной хроматографической камере:

1, 2 — испарение и конденсация паров компонентов элюента из хроматографической камеры; 3 — «полигональная» ТСХ; 4, 5 — испарение и конденсация паров компонентов элюента со смоченной поверхности пластины; 6 — конденсация паров компонентов элюента на сухой поверхности пластины

Рис. IV.8. Двойные («twin») камеры для ТСХ фирмы «Камаг» (Швейцария): а — обычная ТСХ; б — ТСХ с предварительным насыщением слоя парами элюента; в — ТСХ с насыщением слоя парами элюента (одновременно с хроматографированием)

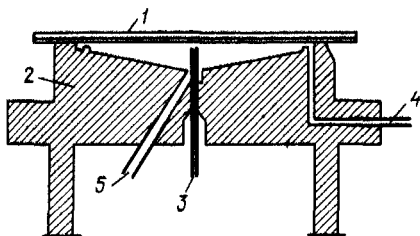


Рис. IV.9. Конструкция U-камеры фирмы «Камаг»:

1 — ТСХ-пластина, 2 — корпус камеры, 3 — платино-иридиевый капилляр для подачи элюента, 4, 5 — вход и выход потока газа, насыщенного парами элюента

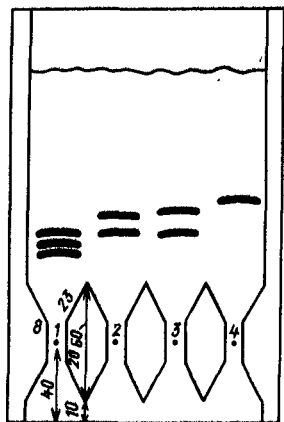


Рис. IV.10. ТСХ с использованием способа подачи элюента по Маттиасу (размеры даны в мм):

1—4 — точки нанесения проб

Маттиасу (рис. IV.10) и треугольная ТСХ. Треугольная ТСХ рекомендуется для препаративного выделения компонентов смеси при нанесении образца на стартовую линию в виде полосы. В процессе восходящей ТСХ зоны будут сжиматься в направлении, перпендикулярном движению элюента.

Для увеличения пиковой емкости в ТСХ используют методы проточной, многократной, градиентной и двумерной ТСХ.

### 3.2.2. Проточная ТСХ (ПТСХ)

ПТСХ применяют для разделения веществ с близкими или малыми значениями  $R_f$ . Наиболее простой вариант ее реализации изображен на рис. IV.11, а, в котором за счет испарения растворителя с верхнего конца пластины, находящегося вне камеры, элюент непрерывно поднимается по слою сорбента. ПТСХ можно проводить и в открытой камере, где испарение элюента происходит по всей поверхности слоя (рис. IV.11, б). Испарительный вариант ПТСХ с локализованной зоной дополнительного испарения (зона высокого разрешения) при нагревании определенной части пластины изображен на рис. IV.11, в. Здесь из-за отрицательного градиента скорости, за счет дополнительного испарения зоны вещества сильно сжимаются, что приводит к лучшему разделению веществ с близкими  $R_f$ . При ПТСХ для веществ с малыми  $R_f$  увеличивается как бы длина пластины, что приводит к лучшему разделению. Однако при этом увеличиваются размывание зон и время анализа. При ПТСХ веществ с близкими,

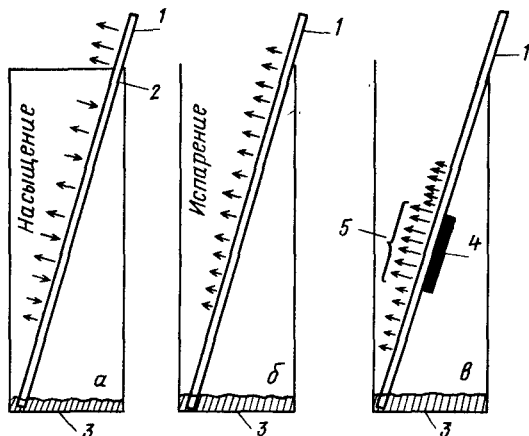


Рис. IV.11. Проточная (а, б) и испарительная (в) ТСХ:

1 — ТСХ-пластина; 2 — отверстие в хроматографической камере; 3 — элюент; 4 — нагревательный элемент; 5 — зона наиболее эффективного разделения

но не малыми  $R_f$  следует оптимизировать селективность элюента (уменьшив его адсорбционную активность) или использовать испарительную ТСХ с локальным нагревом.

### 3.2.3. Многократная ТСХ (МТСХ)

МТСХ — это повторяющееся развитие хроматограммы в одном или двух направлениях, в одном или разных элюентах с постоянным или переменным расстоянием элюции. В этом варианте ТСХ фронт элюента многократно пересекает зону вещества и с каждым разом все больше и больше сжимает ее в направлении движения элюента (рис. IV.12). Видно, что сначала фронт элюента касается нижней границы зоны, затем, пересекая зону, поджимает ее, а дальше зона движется независимо от фронта элюента, размываясь по обычным законам хроматографии.

Относительное расстояние, на которое продвигается зона вещества после  $n$  ступеней хроматографирования ( $nR_f$ ), можно рассчитать по уравнению:

$$nR_f = 1 - (1 - w_R)^n, \quad (\text{IV.13})$$

где  $w_R$  — средняя относительная скорость движения зон.

Оптимальное число ступеней хроматографирования:

$$n_{\text{opt}} = -1 / \ln(1 - w_R). \quad (\text{IV.14})$$

Максимальное разделение двух зон:

$$\Delta X_{n, \text{opt}} = n(1 - w_R)^{n-1} \Delta w_R, \quad (\text{IV.15})$$

где  $\Delta w_R$  — разница средних скоростей движения двух зон.



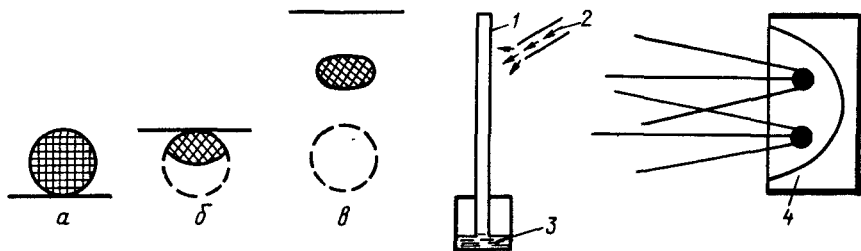


Рис. IV.12. Механизм сжатия зоны при многократной ТСХ:

*а* — фронт элюента касается нижней границы зоны, *б* — фронт элюента проходит через зону, сжимая ее в направлении своего движения, *в* — зона движется после сжатия независимо от движения фронта элюента

Рис. IV.13. Схема многократной ТСХ с программированием подачи элюента на пластину:

1 — пластина, 2 — инертный газ, 3 — элюент, 4 — рефлектор

Применение пластин для ВЭТСХ при МТСХ позволяет оптимизировать разделение сложных смесей, так как дает возможность уменьшить длину пробега и время в каждом цикле. Комбинация МТСХ и испарительной ТСХ позволила создать инструментальный метод ТСХ высокого разрешения — программированную МТСХ (ПМТСХ). Это повторяющаяся ТСХ в одном элюенте в одном направлении с постепенно увеличивающимися расстояниями пробега элюента. Между циклами растворитель удаляют с пластины испарением, проводящимся под автоматическим контролем, не прерывая ее контакта с элюентом (рис. IV.13). При МТСХ сжатие зон происходит дважды: при пересечении ее с фронтом элюента (поджимается нижняя граница зоны) и за счет медленного его отступления при испарении, при этом верхняя граница зоны не движется или движется вниз, а нижняя продолжает двигаться вверх, пока фронт не остановится. В результате зона сильно сжимается при увеличении числа циклов. Показано, что при проведении 68 циклов за 72 ч можно реализовать эффективность, эквивалентную  $100 \cdot 10^3$  т.т.

### 3.2.4. Двумерная ТСХ (ДТСХ)

При ДТСХ пробу наносят в левый угол пластины на расстоянии 1—1,5 см от каждой из сторон и хроматографируют в двух взаимно перпендикулярных направлениях в разных элюентах с промежуточным высушиванием. При отсутствии корреляции между коэффициентами распределения в обоих элюентах пиковая емкость в одномерной ТСХ увеличивается до  $n^2$  в двумерном варианте. Таким образом гипотетически на пластине  $6 \times 6$  см можно в принципе разделить смесь из 50 и более компонентов (в реальных условиях меньше). Могут быть различные варианты

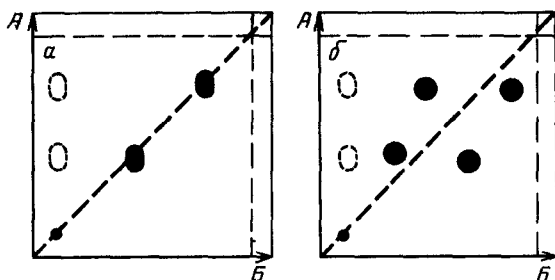


Рис IV.14. Выявление хроматографических артефактов методом двумерной ТСХ:  
а — истинная хроматограмма, б — хроматографический артефакт

ДТСХ. При использовании двухфазных пластин (с обратной и прямой фазами) разделение компонентов смеси может происходить по разным механизмам в разных направлениях элюирования. Изменять свойства сорбента можно после ТСХ в первом направлении пропиткой, например, различными реагентами (комплексобразователи,  $\text{AgNO}_3$  и другие) перед хроматографией во втором направлении. После ТСХ в первом направлении можно изменить свойства разделенных компонентов смеси с помощью химических реакций на пластине (окисление, восстановление, дериватизация).

ДТСХ можно использовать для того, чтобы отличить истинное содержание компонентов в смеси от хроматографических артефактов (например, появление дополнительных зон на пластине за счет химических превращений веществ в процессе хроматографии). При этом проводят ТСХ в обоих направлениях, в одном и том же элюенте и на одно и то же расстояние. Если проба действительно содержит несколько веществ, то после ТСХ в другом направлении они все расположатся по диагонали пластины (рис. IV.14, а). Если же это результат химических превращений, концентрационных эффектов или других артефактов, то кар-

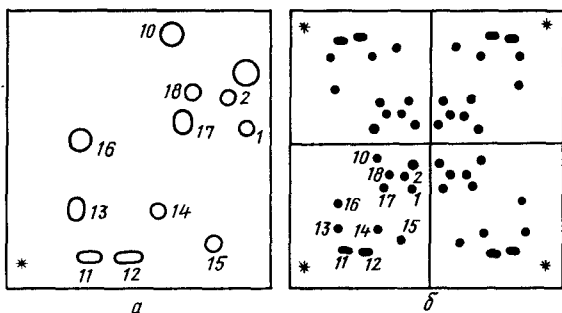


Рис. IV 15 Одна (а) и четыре (б) двумерные хроматограммы смеси ДНС — аминокислот на пластине размером  $6 \times 6$  см.

тина будет как, например, на рис. IV.14, б. Недостатком ДТСХ является возможность хроматографии только одной пробы на пластине и сложность идентификации. На пластинах для ВЭТСХ можно получить, например, четыре двумерных хроматограммы (рис. IV.15), если нанести пробу в четырех углах пластины.

### 3.2.5. Градиентная ТСХ (ГТСХ)

Особенностью ТСХ является возможность осуществления естественно возникающих градиентных условий разделения. Это вариант «полизональной» ТСХ, в которой программирование элюента происходит за счет фронтального разделения многокомпонентного элюента на пластине на зоны разного состава с отставанием зон, содержащих наиболее адсорбционно-активные компоненты. При этом компоненты пробы разделяются внутри зон элюента, соответствующих по диапазонам коэффициентов распределения классам разделяемых веществ. На границах зон пятна сжимаются в направлении движения элюента. Подобное же программирование элюента происходит в камерах сэндвич-конфигурации (с расстоянием между стенками 0,5—2 мм) за счет летучих компонентов элюента при его движении по пластине в газовое пространство камеры. Оба этих варианта ТСХ с программированием элюента не требуют специальных устройств, кроме самой пластинки и хроматографической камеры.

Градиентные условия возможны в круговой и антикруговой, испарительной и многократной ТСХ за счет градиента скорости элюента. В ТСХ применяют слои с изменяющимся градиентом рН для разделения веществ, сильно различающихся по полярности, с градиентом содержания нитрата серебра и др.

С использованием специальной «vario»-камеры фирмы «Камаг» можно создавать слои с градиентом влажности, выдерживая

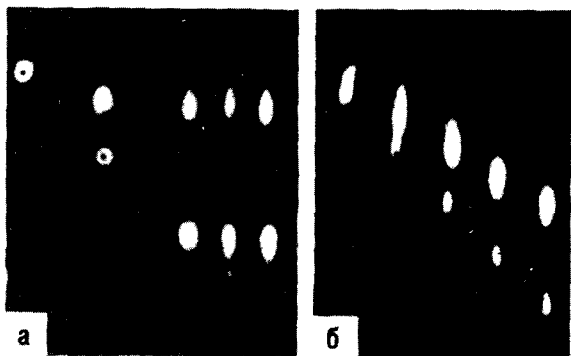


Рис IV.16. Установление наличия (а) или отсутствия (б) градиентных условий ТСХ при нанесении проб по диагонали пластины

пластину над растворами  $H_2SO_4$  в воде различной концентрации, которые наливают в отдельные отсеки камеры. Камера дает возможность быстро подобрать оптимальные условия разделения смеси компонентов (по адсорбционной активности, насыщенности парами разных растворителей, составу элюента и т. д.), а также реализовать и проточную ТСХ. ГТСХ можно проводить и с использованием специальных камер для градиентного элюирования.

Ступенчатый градиент можно получить в сэндвич-камере Сочевинского, последовательно подавая с помощью капиллярного сифона на пластину элюенты разного состава, приготовленные в отдельных сосудах. Наличие градиентных условий на ТСХ-пластине легко определить, нанося исследуемые смеси по диагонали пластины. При наличии градиента на пластине зоны после разделения располагаются по прямым линиям, параллельным линии нанесения (рис. IV.16, а), в отсутствие градиента зоны располагаются на линиях под углом к стартовой линии (рис. IV.16, б).

### 3.2.6. ТСХ с принудительным движением элюента

Ограничением всех методов ТСХ, движение элюента в которых происходит за счет капиллярных сил, является невозможность реализации высоких эффективностей ( $N > 5000$  т.т.) в одномерном варианте, так как для дальнейшего увеличения  $N$  требуется непропорционально большое увеличение времени анализа, связанного к тому же с потерей чувствительности. Методы с принудительным движением элюента позволяют снять эти ограничения [98].

Наиболее широко используют метод ТСХ под давлением (ТСХД), разработанный Тихаком с сотр., для реализации которого сконструированы приборы «Хромпрес-10 и -25», выпускаемые фирмой «Лабор МИМ» (ВНР). В этих камерах можно проводить сэндвич-, круговую, треугольную, антикруговую, двумерную, линейную в одном и двух направлениях, а также аналитическую и препаративную одномерную ТСХ при низком, среднем и высоком давлении на пластинах разного размера на разных подложках, покрытых сорбентом с малым диаметром частиц ( $< 5$  мкм). При этом можно применять элюенты с высокой вязкостью.

ТСХД широко апробирована в анализе аминокислот и их производных (первичная структура белка), природных соединений (глюкозиды, алкалоиды) и др. Интересным развитием ТСХД явился разработанный Кайзером и Ридером метод круговой ТСХ высокого давления (КТСХВД). Этот метод позволяет проводить скоростной анализ, в особенности для ОФТСХ, с высокой точностью и хорошо сочетается с ВЭЖХ.

Преимущества методов ТСХ под давлением — это параллельное, быстрое и эффективное разделение большого числа проб;

возможность элюирования на большие расстояния при использовании сорбента с малым диаметром зерна и вязких элюентов с коротким временем анализа; легкая реализация проточной ТСХ и очистки пластин током элюента; моделирование условий ВЭЖХ, препаративного выделения и др. Однако очень высокие требования предъявляются к качеству слоя. В ротационной ТСХ (РТСХ), разработанной Ньюреди с сотр., движение элюента происходит за счет центробежной силы. Имеется несколько разновидностей РТСХ: в обычной, микро- и ультрамикрокамерах, секционная РТСХ и на плоской колонке. РТСХ используют для препаративных и аналитических целей. Для ее реализации разработан прибор «Ротахром». Метод позволяет работать с круговым вариантом ТСХ. В этом варианте ТСХ также можно использовать сорбент с малым диаметром частиц с элюцией на расстояние 8—11 см. Процесс разделения можно наблюдать с помощью УФ-ламп. Время разделения мало (1—1,5 мин на образец).

## Глава 4

### СПОСОБЫ ОБРАБОТКИ ТСХ-ПЛАСТИН

#### 4.1. ОБНАРУЖЕНИЕ БЕСЦВЕТНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Одним из преимуществ ТСХ является возможность широкого варьирования детектирующих средств для обнаружения бесцветных соединений на хроматограммах. Можно предложить следующую общую классификацию способов детектирования в ТСХ: 1) без применения химических реагентов, регистрация поглощения веществ в УФ-области, регистрация собственной флуоресценции веществ; 2) с применением химических реагентов — универсальные, специфические.

Первый способ основан на введении в слой адсорбента флуоресцентных индикаторов (люминофоров), которые при облучении УФ-светом возбуждаются при такой длине волны, при которой детектируемые вещества поглощают. При этом они становятся хорошо видны в виде темных зон на светящемся фоне (зеленоватом) сорбента. Пластины с флуоресцентными индикаторами с  $\lambda = 254$  и  $365$  нм выпускают многие фирмы. Тот же принцип детектирования реализуют, опрыскивая пластины флуоресцирующими реагентами (водные растворы флуоресцеина натрия или родамина В, растворы морина в метаноле, 2'-; 7'-дихлорфлуоресцеина в этаноле).

Одним из наиболее чувствительных методов детектирования является способ, в котором собственную флуоресценцию наблюдают при облучении пластин УФ-светом с длиной волны, возбуждающей флуоресценцию данного соединения.

Имеются специальные средства, усиливающие флуоресценцию некоторых веществ. Многие вещества, не флуоресцирующие и не фосфоресцирующие в УФ-свете при комнатной температуре, становятся видимыми при температуре жидкого азота (на пластину наливают жидкий азот и освещают УФ-светом). Существует много химических реагентов, которые превращают нефлуоресцирующие вещества в флуоресцирующие при обработке до или после ТСХ.

При детектировании вторым способом в качестве универсальных реагентов используют концентрированные кислоты, в первую очередь — серную кислоту. После опрыскивания пластин некоторые соединения видны на холоду, многие проявляются после нагревания при разных температурах. Для обнаружения химически инертных соединений к серной кислоте добавляют 5% азотной кислоты или окислители ( $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ). В качестве общих реагентов на органические соединения используют фосфорную, хлорную и другие кислоты. Широко применяют в ТСХ, как общий реагент, иод (пары, опрыскивание метанольным раствором иода). Описано много других общих реагентов, применяемых в ТСХ.

Многочисленную группу составляют специфические реагенты на индивидуальные соединения и отдельные классы соединений. Визуализацию веществ на тонкослойных хроматограммах проводят, опрыскивая пластину соответствующими реагентами с дополнительной обработкой при необходимости (например, нагревание), выдерживая в парах реагентов, пропитывая пластину до или после ТСХ соответствующими реагентами. Особенностью ТСХ является возможность последовательного использования нескольких реагентов для детектирования разных классов соединений или соединений с разными функциональными группами.

Так, при исследовании состава сложных смесей липидов на пластинах с силикагелевым связующим пластину последовательно опрыскивают нингидрином (липиды со свободной аминогруппой), молибдатным реактивом (главные фосфолипиды) с последующим нагреванием при  $180^\circ\text{C}$  (все присутствующие в смеси липиды), реактивом на основе малахитового зеленого (контроль результатов, полученных с помощью молибдатного реактива, и обнаружение фосфолипидов, присутствующих в очень малых количествах). Для опрыскивания пластин применяют пульверизаторы разной конструкции или продажные реагенты в аэрозольной упаковке. Точность количественных определений сильно зависит от качества и воспроизводимости детектирования, в особенности при опрыскивании хроматограмм.

Широко используют в ТСХ пред- и пост-derivатизацию исследуемых соединений. Обычно целью derivатизации в ТСХ является повышение чувствительности анализа при введении хромофоров или флуорофоров в молекулы исследуемых соединений. Это

может быть достигнуто как пост-, так и пред-хроматографическими методами. Пред-хроматографическая дериватизация может также повышать специфичность разделения компонентов смеси, например, за счет изменения хроматографического поведения близких по химической структуре или хроматографическим свойствам соединений. Дериватизация может также увеличить стабильность (например, к окислению или разложению), понизить адсорбционную активность, улучшить растворимость или другие свойства анализируемых веществ. Однако это дополнительная стадия в хроматографическом процессе, которая может быть достаточно трудоемкой и длительной.

Пост-хроматографическая дериватизация — это практически метод детектирования разделенных компонентов. Преимущество этого метода также в том, что дериватизация всех разделенных проб происходит одновременно, можно оптимально использовать кинетику реакций при различном уровне концентрации (скорость реакции мало зависит от концентрации вещества в растворе, так как дериватизация происходит на сухой пластине). Пост-хроматографическая дериватизация не влияет на хроматографическое разделение химически близких веществ. Оба метода имеют также и определенные ограничения.

Преимущество пост-хроматографической дериватизации в ТСХ по сравнению с ВЭЖХ — в значительно большей гибкости метода, позволяющего, например, за счет последующей пропитки пластин в специальных растворах значительно увеличить чувствительность флуоресценции.

В табл. IV.7 приведены некоторые реагенты для пред- и пост-хроматографической дериватизации разных классов соединений в ТСХ.

Кроме специальных химических реагентов, образующих флуоресцентные производные с исследуемыми соединениями, приведенных в табл. IV.7, в ТСХ используют пропитку пластин после ТСХ в различных растворах или выдерживание в парах каких-либо веществ для возбуждения или стабилизации флуоресценции, а также увеличения ее интенсивности.

Описан количественный анализ углеводов с использованием одиннадцати различных методов пост-хроматографической дериватизации при погружении пластин в соответствующие реагенты. При этом предел детектирования углеводов был понижен до 5—30 нг/пятно.

Ниже приведены примеры простых способов пост-дериватизации некоторых соединений. Так, лецитин и сфингомиелин превращаются в флуоресцирующие производные при погружении пластины после ТСХ в 0,2 М раствор  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  в 30 мл воды, 30 мл метанола и 2 мл концентрированной  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , с последующим нагреванием в течение 20 мин при 120 °С. Интенсивность флуоресценции увеличивается в 2 раза после погружения

Таблица IV.7. Реагенты для пред- и пост-derivатизации в ТСХ

Реагент для дериватизации	Хроматографируемое вещество	Образующиеся соединения	Длина волны возб., флуор., нм	Чувствительность обнаружения, нг/пятно	Примечание
Гидразид изоникотиновой кислоты (пост-)	Тестостерон	Гидразид изоникотиновой кислоты тестостерона	$\lambda = 365$ $\lambda > 430$	0,5—4,5	Реагент I усиливает чувствительность в 11 раз
Дансилгидразин (пред-)	»	Дансилгидразиновое производное тестостерона	$\lambda = 365$ $\lambda > 430$	200—10	Реагент II усиливает чувствительность в 29 раз
2,3,1-Диаминонафталин (пред-)	Селен в питьевой воде ( $H_2SeO_3$ )	2,1,3-Нафтоселенодиазол	$\lambda = 365$ $\lambda > 560$	5—50 0,001—0,01 0,025—0,001	I II
Цинк хлористый	Углеводы	Хелатные комплексы	$\lambda = 365$	20	III

I смесь: парафиновое масло — гексан (2:1); II смесь тритон X—100-хлороформ (1:4); III — смесь 20%-й раствор диоктилсульфосукцината в хлороформе.



пластины в реагент I (см. табл. IV.7). Чувствительность детектирования — 10—100 нг/платно.

Интересные возможности для детектирования карбамазепина (антиэпилептическое средство) открывает ТСХ с пост-хроматографическим детектированием. Собственная флуоресценция этого соединения ( $\lambda_{\text{возб}} = 313$  нм,  $\lambda_{\text{фл}} = 390$  нм) нестабильна. Однако она стабилизируется и увеличивается в 20 раз при погружении в реагент I (см. табл. IV.7). Выдержка пластины в парах HCl в течение 5 мин с последующим облучением УФ-светом увеличивает интенсивность флуоресценции по сравнению с интенсивностью в предыдущем способе в 2 раза. Погружение пластины в 20%-й раствор перхлорной кислоты в этаноле увеличивает интенсивность флуоресценции в 20 раз по сравнению с интенсивностью в первом методе. Последующая же обработка реагентом [парафиновое масло — хлороформ — триэтаноламин (1:6:1)] увеличивает флуоресценцию карбамазепина в 30 раз (чувствительность определения 100—900 пг).

#### 4.2. ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Одним из способов идентификации веществ в ТСХ является определение  $R_f$  разделенных соединений и сравнение их с  $R_f$  реперных образцов. Однако из-за плохой воспроизводимости условий при обычной ТСХ абсолютные значения  $R_f$  практически имеют мало смысла. Удобство ТСХ заключается в том, что всегда можно одновременно с исследуемой смесью хроматографировать и реперные образцы, сопоставляя таким образом их подвижности на одной пластинке в одинаковых условиях. В таком варианте идентификация при одномерной ТСХ облегчается.

В ТСХ для идентификации веществ часто используется метод с внутренним стандартом (отношение пробега исследуемого вещества к пробегу какого-либо стандартного соединения). В ТСХ кроме сравнения подвижности исследуемого вещества с подвижностью репера, для дополнительной идентификации можно использовать специфические реагенты и, наконец, извлечение вещества с определением его структуры независимым методом (ЯМР, ИКС, ГХ и др.). Интересные возможности для идентификации многокомпонентных смесей дает спектроденситометрический метод, который позволяет получить количественную и качественную информацию после ТСХ для отдельных зон на основании электронных спектров диффузионного отражения. Из полученных спектров можно выбрать оптимальную длину волны для количественных определений исследуемых соединений. Анализ соединений с бензольным хромофором или сопряженными системами позволяет исключить операцию визуализации. При двумерной ТСХ реперные образцы наносят параллельно с исследуемой смесью в обоих направлениях. Для окончательной идентификации наносят в одну

точку исследуемый образец и предполагаемый репер и проводят двумерную ТСХ. При этом зона предполагаемого репера или совпадает с зоной исследуемого вещества, или не совпадает (в случае совпадения делается вывод о соответствии исследуемого вещества реперу).

#### 4.3. ДОКУМЕНТАЦИЯ

Тонкослойную хроматограмму можно перерисовать, получить контактные отпечатки или сфотографировать на пленку, получить денситограмму или законсервировать, например, опрыскивая специальным составом, например Neatan (фирмы «Мерк») до полного смачивания слоя. Затем пластину высушивают, нагревая при 100 °С, прижимают к поверхности слоя специальную липкую ленту и погружают пластинку в воду. Подложку отделяют, слой высушивают и хранят, наклеивая на листы бумаги. Состав для фиксации хроматограмм — «силуфикс» в аэрозольной упаковке выпускает фирма «Кавалиер» (ЧСФР).

### Глава 5

## КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ ТСХ-АНАЛИЗ [99]

Количественные методы в ТСХ можно разделить на две группы: 1) извлечение с пластины адсорбента с зоной вещества с последующим определением его количества независимыми методами; 2) определение количества вещества непосредственно на пластине (in situ). Методы второй группы разделяются на две подгруппы: измерение (или визуальная оценка) размера пятна (площадь зоны или ее длина) и инструментальные (сканирование пластины после ТСХ с регистрацией показаний детектирующей системы). Сканирующие методы — это оптические ОМ (отражение, пропускание, отражение — пропускание, флуориметрия, гашение флуоресценции); ядерно-физические ЯФМ (автордиография\*, сцинтилляция\*, ионизация); электрохимические ЭХМ (полярография, кондуктометрия); с применением детекторов для газовой хроматографии ДГХ [пламенно-ионизационные (ПИД), катарометры, электронного захвата и др.]; ферментативные ФМ (биоавтография\*).

Количественный анализ при использовании проточной ТСХ, когда регистрируются вещества на выходе с пластины, не имеет никаких преимуществ перед обычной колоночной ЖХ. Поэтому

---

\* Денситометрия не самой пластины, а контактных отпечатков с нее на фотографическую или рентгеновскую пленку.

применение проточных ТСХ-хроматографов может быть очень ограниченным.

**Методы, основанные на измерении размера пятна.** В обычной ТСХ широкое распространение получили полуколичественные методы, основанные на измерении параметров, характеризующих форму (геометрию) хроматографических зон. Эмпирически было установлено, что в пределах величин, обычно встречающихся в ТСХ, существует линейная зависимость:

$$\sqrt{S} = n \lg q + p, \quad (\text{IV.16})$$

где  $S$  — площадь пятна;  $q$  — масса вещества;  $n, p$  — константы, определяемые из калибровочных опытов.

Однако из-за несовершенного детектирования границ пятна эта зависимость не всегда выполняется. Поэтому количественная оценка может быть проведена только прямым сравнением с серией эталонных растворов, которые обычно наносят на одну пластину с исследуемыми образцами. Строят графическую зависимость в координатах  $\sqrt{S} - \lg q$  по эталонным образцам и по ней определяют количество неизвестного образца. Было показано, что формула справедлива только при небольшой разнице в количестве вещества в исследуемых зонах (при значительном различии коэффициенты  $n$  и  $p$  перестают быть постоянными). Для более точного определения границ зоны целесообразно использовать фотографии тонкослойных хроматограмм на сверхконтрастных фотоматериалах с последовательной многократной фотопечатью (поскольку при этом для фотографического процесса контрастность изображения резко увеличивается).

Удобно использовать метод внутреннего стандарта. При этом готовят три раствора: 1) с неизвестной концентрацией определенного вещества; 2) разбавленный в 11 раз раствор 1; 3) раствор 2 с добавлением определенного количества эталона. Эти растворы в равных стандартных объемах наносят на пластину и после проведения ТСХ определяют (количество неизвестного образца) по формуле:

$$\lg [(q_x d + q) / q_x] = [(\sqrt{S_x} + S - \sqrt{S_x}) / (\sqrt{S_x} + \sqrt{S_s})] \lg d, \quad (\text{IV.17})$$

где  $S_x$  — площадь пятна неизвестного образца;  $S$  — площадь пятна неизвестного образца в разбавленном растворе;  $S_s$  — площадь пятна эталонного образца с известной концентрацией.

В случае, когда необходимо знать содержание вещества в пробе, большее или меньшее какого-либо количества, можно пользоваться визуальным методом оценки с нанесением на пластину одновременно с анализируемым образцом известного количества стандартного раствора.

В ТСХ в зависимости от вида изотермы адсорбции длина хроматографической зоны с увеличением количества вещества может изменяться. Поэтому количественный анализ в ТСХ может

применение проточных ТСХ-хроматографов может быть очень ограниченным.

**Методы, основанные на измерении размера пятна.** В обычной ТСХ широкое распространение получили полуколичественные методы, основанные на измерении параметров, характеризующих форму (геометрию) хроматографических зон. Эмпирически было установлено, что в пределах величин, обычно встречающихся в ТСХ, существует линейная зависимость:

$$\sqrt{S} = n \lg q + p, \quad (IV.16)$$

где  $S$  — площадь пятна;  $q$  — масса вещества;  $n$ ,  $p$  — константы, определяемые из калибровочных опытов.

Однако из-за несовершенного детектирования границ пятна эта зависимость не всегда выполняется. Поэтому количественная оценка может быть проведена только прямым сравнением с серией эталонных растворов, которые обычно наносят на одну пластину с исследуемыми образцами. Строят графическую зависимость в координатах  $\sqrt{S} - \lg q$  по эталонным образцам и по ней определяют количество неизвестного образца. Было показано, что формула справедлива только при небольшой разнице в количестве вещества в исследуемых зонах (при значительном различии коэффициенты  $n$  и  $p$  перестают быть постоянными). Для более точного определения границ зоны целесообразно использовать фотографии тонкослойных хроматограмм на сверхконтрастных фотоматериалах с последовательной многократной фотопечатью (поскольку при этом для фотографического процесса контрастность изображения резко увеличивается).

Удобно использовать метод внутреннего стандарта. При этом готовят три раствора: 1) с неизвестной концентрацией определенного вещества; 2) разбавленный в 11 раз раствор 1; 3) раствор 2 с добавлением определенного количества эталона. Эти растворы в равных стандартных объемах наносят на пластину и после проведения ТСХ определяют (количество неизвестного образца) по формуле:

$$\lg [(q_x d + q) / q_x] = [(\sqrt{S_x} + S - \sqrt{S_x}) / (\sqrt{S_x} + \sqrt{S_x})] \lg d, \quad (IV.17)$$

где  $S_x$  — площадь пятна неизвестного образца;  $\tilde{S}$  — площадь пятна неизвестного образца в разбавленном растворе;  $S$  — площадь пятна эталонного образца с известной концентрацией.

В случае, когда необходимо знать содержание вещества в пробе, большее или меньшее какого-либо количества, можно пользоваться визуальным методом оценки с нанесением на пластину одновременно с анализируемым образцом известного количества стандартного раствора.

В ТСХ в зависимости от вида изотермы адсорбции длина хроматографической зоны с увеличением количества вещества может изменяться. Поэтому количественный анализ в ТСХ может

быть также организован на основе зависимости количества вещества от длины хроматографической зоны, которая в определенной области концентрации может быть легко измерена.

**Оптические методы.** В связи с быстрым развитием ВЭТСХ, которая позволила стандартизировать многие стадии хроматографического процесса и привела к получению воспроизводимых результатов, стало возможным использовать точные количественные методы оценки разделенных веществ на тонкослойных хроматограммах. Этому также способствовали создание и выпуск рядом фирм специальных приборов для количественных определений в ТСХ. Оптические сканирующие методы основаны на измерении исходного излучения, прошедшего через слой сорбента (поглощение), отраженного от него (отражение), сочетании поглощения и отражения, флуоресценции, гашении флуоресценции. Возможно измерение пропускания света с длиной волны только больше 325 нм, так как стекло (подложка) и слой адсорбента поглощают УФ-излучение. Измерение по методу отражения можно проводить по всей области спектра от 196 до 2500 нм (и в области УФ-излучения).

Существенный недостаток количественных методов анализа тонкослойных хроматограмм, основанных на измерении пропускания света, был связан с нелинейной зависимостью сигнала оптического детектора от количества вещества в хроматографическом пятне. Эта нелинейность обусловлена специфическим законом прохождения света в рассеивающей среде, описываемым уравнением Кубелки — Мунка, и неоднородностью пластины по толщине слоя адсорбента. Последнюю можно учесть, измеряя оптические свойства подложки непосредственно в хроматографическом пятне. Использование двухволнового метода спектрофотометрического детектирования, когда излучение одной волны  $\lambda_1$  поглощается и веществом, и адсорбентом, а другой волны  $\lambda_2$  — только адсорбентом, позволяет выделить сигнал, связанный с поглощением излучения только анализируемым веществом. Дальнейшая обработка сигнала детектора в соответствии с уравнением Кубелки — Мунка позволяет линеаризовать зависимость оптического сигнала от количества вещества в ТСХ. Поглощение света адсорбентом может быть учтено также при спектрофотометрическом сканировании пластины на просвет и отражение. Эти принципы реализованы в лучших современных зарубежных денситометрах — флуориметрах. Менее точным, но более простым решением является линеаризация зависимости сигнал — вещество с помощью двойного логарифмирования (с использованием ЭВМ). В результате этих усовершенствований воспроизводимость результатов в современной количественной ВЭТСХ приближается к 1%. Использование двухкоординатного сканирования в случае эллипсовидных пятен (двумерное размывание зон в ТСХ) и многошагового сканирования пятен неправильной формы (дву-

мерная ТСХ) с применением денситометра с точечным световым зондом позволяет добиться достаточной точности ( $\approx 1\%$ ). Измерение по методу отражения можно проводить по всей области спектра (от УФ- до видимого света).

Одновременное измерение интенсивности отражения и пропускания на одном и том же участке слоя при одной и той же длине волны позволяет выровнять нулевую линию и увеличить соотношение сигнал/шум, что снижает предел обнаружения.

Метод измерения отражения и гашения флуоресценции можно также применять при ТСХ веществ, поглощающих УФ-излучение. Метод гашения флуоресценции позволяет определять только вещества с максимумом поглощения выше 240 нм, так как максимум возбуждения обычно используемого флуоресцентного индикатора находится около 280 нм. Сравнивая эти методы, можно сказать, что наилучшие результаты дает количественное детектирование по отражению по сравнению с пропусканием и гашением флуоресценции. Наиболее эффективным методом количественного анализа является измерение интенсивности флуоресценции веществ в слое сорбента. Это — высокоселективный, высокочувствительный (особенно при использовании лазерных флуоресцентных детекторов) метод анализа с широким интервалом линейной зависимости количество вещества — интенсивность флуоресценции, не зависящий от формы зоны. Широкие возможности метода флуоресцентного детектирования в ТСХ связаны с возможностями дериватизации веществ до или после ТСХ с превращением их в флуоресцирующие производные или инициированием флуоресценции разделенных веществ электрохимическими или химическими методами.

Многие фирмы выпускают оборудование для оптического детектирования тонкослойных хроматограмм. Это — универсальная сканирующая установка фирмы «Оптон» («Цейс», ФРГ — США), на которой можно работать в проходящем, отраженном свете, измерять флуоресценцию, гашение флуоресценции. Все операции полностью автоматизированы. Фирма «Шимадзу» (Япония) выпускает сканирующие устройства (модели CS-910, 920, 930, 9000) с двухволновым сканированием с интервалом 200—800 нм с использованием однолучевой системы с переменной и постоянной длиной волны, двухлучевой системы и флуориметра. Двухлучевая модификация позволяет количественно определять какое-либо вещество в хроматографическом пятне, в котором присутствует еще одно вещество. Фирма «Камаг» (Швейцария) выпускает сканеры, позволяющие измерять поглощение, флуоресценцию, гашение флуоресценции в варианте на отражение при круговом и антикруговом методах ТСХ с макро- и микро-щелью. Ленинградское оптико-механическое объединение выпускает прибор для количественной ТСХ «МФТХ-2», работающий в комплексе с микро-ЭВМ «ДВК-3». Прибор позволяет регистрировать интенсивность поглощения или отражения монохроматического пучка света, ин-

тенсивность флуоресценции вещества или гашения флуоресценции при сканировании точечным световым зондом. Используемый диапазон длин волн 240—700 нм, предел детектирования поглощающих веществ  $10^{-8}$  г, флуоресцирующих  $10^{-10}$  г, воспроизводимость количественных измерений 1%.

**Другие методы.** Электрохимические методы (ЭХМ) пока не нашли широкого применения для количественной оценки тонкослойных хроматограмм, хотя могут значительно расширить возможности ТСХ при анализе неорганических и органических электролитов. ЭХМ отличаются высокой селективностью и быстротой. Чувствительность этих методов сильно зависит от природы анализируемых соединений и возможностей детектора. ЭХМ позволяют детектировать анализируемые вещества непосредственно в слое сорбента на пластине, после выделения зоны вещества с сорбентом без его жидкостного извлечения или после него. Используют также варианты количественной проточной ТСХ.

Ядерно-физические методы применяют для количественных определений радиоактивно меченых соединений. В ТСХ наиболее часто в качестве меток используют тритий и радиоактивный водород. ЯФМ характеризуются высокой чувствительностью, селективностью и воспроизводимостью, длительность же детектирования значительно выше по сравнению с оптическими и ЭХМ. Однако благодаря специфике метода в радиохроматограммах все разделенные зоны можно оценивать одновременно. Радиохроматограммы можно оценивать как непосредственно на слое, так и после извлечения из слоя зон с разделенными веществами.

ЯФМ можно подразделить на автордиографические, ионизационные и сцинтилляционные. Эти методы могут также использоваться в сочетании друг с другом.

В табл. IV.8 приведена характеристика основных методов детектирования радиоактивных веществ в ТСХ.

Количественная оценка тонкослойных хроматограмм с помощью детекторов для ГХ (ДГХ) состоит из двух этапов: перевод анализируемых веществ со слоя в газовую фазу и количественный анализ полученных смесей ДГХ (катарометр, ПИД, детектор электронного захвата, термоионный и др.). Наиболее широко применяют метод, реализованный в приборе «Иатроскан» ТН-10 (Япония) с применением ПИД. Вместо пластин для ТСХ при этом используют стекляннно-керамические стержни диаметром 0,9 мм, на которые нанесен слой силикагеля толщиной 50—100 мкм по специальной технологии.

Сигнал детектора при протягивании через него стержня во многом зависит от летучести анализируемых соединений. Поэтому этот метод оптимален для веществ средней летучести. Метод ТСХ — ПИД нашел широкое применение для анализа липидов, полимеров, алкалоидов, аминокислот и соединений других классов. Преимущество метода ТСХ — ПИД — в его универсальности и

*Таблица IV.8. Характеристика основных методов детектирования радиоактивных веществ в ТСХ*

Метод	Эффективность счета, %	Предел определения, кюри	Время анализа	Разрешение, мм
Авторадиография	60 ( $^{14}\text{C}$ )	$10^{-7}$ — $10^{-8}$	Часы, дни	1—6
Использование жидких сцинтилляторов	55 ( $^3\text{H}$ )	$10^{-7}$ — $10^{-9}$	Минуты, десятки минут	1—2
Сканирующие сцинтилляционные детекторы	20—25	$10^{-8}$ , $10^{-10}$	Десятки минут, часы	2—6
Введение сцинтиллятора в сорбент	15 ( $^3\text{H}$ ), 50—70 ( $^{14}\text{C}$ )	$10^{-9}$	То же	2—7
Сканирующие ионизационные детекторы	3 ( $^3\text{H}$ )	—	»	2—5
Камеры	5 ( $^3\text{H}$ ) 44 ( $^{14}\text{C}$ )	$10^{-8}$	Минуты	2—5
Электронные каналные умножители	5 ( $^3\text{H}$ ) 47 ( $^{14}\text{C}$ )	$10^{-8}$	Минуты, часы	1—2

достаточно высокой чувствительности ко всем классам органических соединений.



## КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

### Глава I

#### МЕТОДЫ ПЕРВИЧНОЙ ОБРАБОТКИ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

Хроматографические методы широко применяют для количественного анализа газообразных и жидких проб. Обработку хроматографической информации обычно разделяют на две стадии: первичная обработка результатов анализа и вторичная обработка полученных на первой стадии данных.

Первичными данными хроматографического анализа считают выходные сигналы хроматографа. В случае регистрации выходного сигнала в аналоговой форме на ленте регистратора в виде хроматографических пиков его нормируют по высоте и времени удерживания, а площади могут быть рассчитаны вручную или с помощью различных приспособлений. При регистрации выходного сигнала хроматографа в цифровой форме нормирование проводят по площади или высоте пика, по безразмерной величине, пропорциональной площади пика, и по времени удерживания хроматографических пиков.

Учитывая изложенное, первичная обработка результатов анализа включает определение времен удерживания анализируемых компонентов смеси, определение высот или площадей пиков этих компонентов, их нормирование с учетом различия показаний используемого детектора к разным компонентам смеси и вычисление содержания каждого компонента в смеси.

Вторичная обработка предполагает получение новых сведений о проведенном анализе на основе учета данных первичной обработки. Сюда входят идентификация неизвестных соединений анализируемых веществ по объемам удерживания или по отношению выходных сигналов различных детекторов с использованием банка данных; проведение калибровки различных типов детекторов; представление результатов в различной форме; проведение вычислений и преобразований с результатами первичной обработки (в том числе эффективностью и качеством); представление зависимостей параметров эксперимента от результатов первичной обработки; оптимизация результатов анализа; вычисление коэффициентов чувствительности и индексов удерживания и т. п.

Методы измерения выходных сигналов можно разделить на 4 группы: измерение высот пиков; измерение величин, пропорциональных площади пиков; измерение площади пиков; измерение времен или объемов удерживания.

Первые три группы данных используют для вычисления количественного состава смеси, а последнюю группу — для идентификации известных соединений в пробе.

Точность методов расчета состава смеси различна. Некоторые экспериментаторы считают, что наиболее точные результаты можно получить методом расчета высот пиков, другие предпочитают метод расчета площадей пиков. Считается, что площадь пика в меньшей степени зависит от рабочих условий, чем его высота. Поэтому метод измерения площадей получил в нашей стране и во многих других странах большее распространение, чем измерение высот.

**Измерение высот пиков.** Высоту пика измеряют линейкой или с помощью цифрового вольтметра. Этот метод измерения пиков является наиболее быстрым и простым, однако зависимость высоты пика от количества вещества линейна в меньшем диапазоне по сравнению с площадью или пропорциональной ей величиной. Поэтому при калибровке детектора по высотам необходимо иметь в виду, что перегрузка колонки может привести к уменьшению линейного диапазона детектора. Следует также учитывать, что высота пика пропорциональна количеству неподвижной фазы в колонке (чем меньше неподвижной фазы, тем выше пик). Рассчитано, что улет непривитой неподвижной фазы в колонке за 2000 ч работы (1 год) составляет около 50% ее общего количества или 0,2% в день, при этом высота пика увеличивается также примерно на 0,2% в день. Таким образом, даже незначительный улет неподвижной фазы из колонки может влиять на погрешность анализа при расчете состава по высотам пиков.

При использовании для расчета высот пиков предъявляются наименьшие требования к степени разделения компонентов, поскольку даже при малых коэффициентах разделения и в случае перекрытия пиков в максимуме пика обычно не бывает примесей других компонентов. При калибровке по высотам пиков температура колонки и дозатора, объем дозатора и соединительных линий, а также перепад давления в колонке должны оставаться постоянными.

Измерение высоты и площади пика с изменением расхода газа-носителя различно для различных типов детекторов. Для детекторов концентрационного типа ДТП, ДП, ДЭЗ от расхода газа-носителя зависит площадь пика и не зависит его высота. Для потоковых детекторов (ДИП, ДТИ, ДПФ) с повышением расхода площадь остается постоянной, а высота пика увеличивается, так как увеличивается поток компонента. С увеличением температуры в колонке ширина пика уменьшается, а высота увеличивается. Для концентрационных детекторов площадь пика при этом не меняется.

При более точном рассмотрении на площадь пика влияет

значительно большее число факторов. Например, при количественном анализе газовых смесей с применением ДТП на воспроизводимость измерения влияет также и размер пробы. В идеальном случае следует хроматографировать настолько малые пробы, насколько возможно.

Метод измерения высот пиков малопригоден для расчета состава в условиях программирования температуры, так как высоты пиков изменяются приблизительно на 4—5% при изменении температуры колонки всего на 1 °C.

В то же время удалось показать, что воспроизводимость измерения высот пиков значительно лучше, чем площадей даже при использовании для вычисления площади цифрового интегратора с автоматической коррекцией дрейфа нуля. Дополнительным преимуществом метода измерения высот пиков является возможность воспроизводимых измерений для частично разделенных пиков и пиков, выходящих на хвосте другого пика.

Несмотря на ряд недостатков, присущих расчету количественного состава с использованием высот пиков, необходимо отметить, что так как калибровку детектора (при работе с детекторами, требующими калибровки) необходимо проводить в любом случае, этому методу следует уделить должное внимание как наиболее простому методу измерения пиков.

**Измерение величин, пропорциональных площади пиков.** В методе геометрической аппроксимации измеряется площадь соответствующего пику треугольника по произведению высоты пика  $h$  или половины высоты пика ( $h/2$ ) на ширину пика ( $b$ ), определяемую как расстояние между точками пересечения касательных, проведенных в точках перегиба пика, с нулевой линией (рис. V.1, а). Применяют также способ измерения ширины пика на различной высоте. При этом измерение площади пика состоит из следующих стадий: 1) логическое продолжение нулевой линии под пиком; 2) измерение высоты пика от этой линии независимо от ее наклона; 3) определение промежуточной высоты (в случае необходимости); 4) измерение ширины пика на этой высоте; 5) вычисление площади пика; пропорциональной произведению высоты пика на ширину. Погрешность измерения площади пика

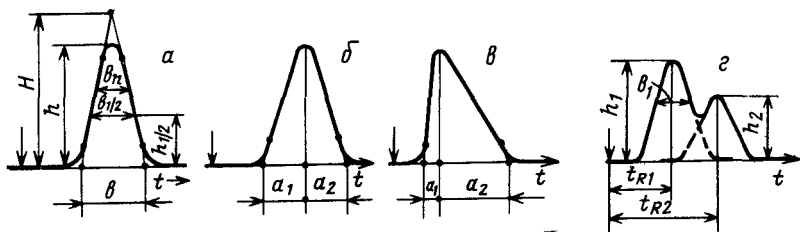


Рис. V.1. Различные типы хроматографических пиков:

а — расчет площади пика методом треугольников, б — симметричный пик ( $k_{ac}=a_2/a_1=1$ ), в — не симметричный пик ( $k_{ac}=a_2/a_1>1$ ), з — не полностью разделенные пики

определяется ошибками всех проведенных операций и зависит от аккуратности и правильности построения треугольника, формы пика, толщины острия карандаша и других факторов. Этот метод дает менее 97% от действительной площади пика, если пик имеет форму кривой Гаусса.

Площадь пика может быть определена по формуле

$$S = k h b. \quad (V.1)$$

Константа  $k$  зависит от промежуточной высоты  $h_x$ . Значения  $k$  для вычисления площади пика в зависимости от высоты, на которой измеряют ширину пика, и для формы пика, близкой к кривой Гаусса, приведены ниже:

$h_x/h$	.	.	.	0,0	0,35	0,400	0,450	0,500	0,550	0,600
$k$	.	.	.	0,5	0,8648	0,9255	0,9927	1,066	1,148	1,241
$h_x/h$	.	.	.	0,650	0,700	0,750	0,800	0,882	0,900	1,0
$k$	.	.	.	1,351	1,485	1,654	1,677	2,507	2,73	—

По приведенным данным можно построить график зависимости  $k$  от  $h_x$  для быстрого нахождения коэффициента  $k$  на различной высоте.

Погрешность измерения площади пика зависит от погрешности измерения его высоты и ширины. Погрешность мала, если абсолютные значения высоты и ширины пика не очень малы. Относительная погрешность измерения площади пика является функцией отношения высоты пика к его ширине.

Относительная погрешность измерения площади пика больше для узких и небольших широких пиков. Существует оптимальная форма пика, для которой погрешность измерения площади пика минимальна. Оптимальное отношение высоты пика к его ширине, измеренной на половине высоты, находится в пределах от 4 до 10.

На хроматограмме в изотермическом режиме не все пики измеряются с одинаковой погрешностью, поскольку они имеют различную ширину и высоту. Методы программирования температуры или расхода газа-носителя позволяют получить для всех компонентов смеси с широким интервалом температур кипения примерно одинаковые по форме пики, для которых отношение высоты к ширине пика соответствует наименьшей погрешности измерения.

Необходимо отметить также, что погрешность метода измерения существенно зависит от формы выходной кривой. Более точные результаты получены для симметричных пиков, коэффициент асимметрии которых близок к 1 (рис. V.1, б). С увеличением коэффициентов асимметрии (рис. V.1, в) погрешность возрастает. Относительная погрешность измерения площадей пиков методом геометрической аппроксимации колеблется от 0,3 до 3% (отн.).

Иногда используют «хронометрический» метод вычисления величины, пропорциональной площади пика, дающий большую точность, чем метод аппроксимации, и применяемый в тех случаях,

когда нет необходимости в интеграторе. Этот метод основан на измерении ширины пика на определенной высоте с помощью секундомера. При ширине пика не менее 40 с погрешность определения ширины пика с помощью этого метода составляет около 0,5%.

В случае ручного измерения площадей пиков на ленте регистратора метод не зависит от погрешностей, связанных с нестабильностью скорости диаграммной ленты. Получено стандартное отклонение площади пика 0,55% как для симметричных, так и для несимметричных пиков (вода). Метод аппроксимации при тех же условиях дает стандартное отклонение 1,6% для симметричных и 4,2% для несимметричных пиков.

При неполном разделении пиков экстраполируют вручную или автоматически очертания пиков, считая, что они не накладываются (рис. V.1,з). При этом замеряют высоты  $h_1$  и  $h_2$  и ширину  $b_1$ . Если ширину пика  $b_2$  измерить невозможно, то наличие линейной зависимости между значениями  $b$  для компонентов смеси и их временами удерживания позволяет определить ее по графику  $(b - t_R)$  или вычислить по формуле

$$b_2 = t_{R2} b_1 / t_{R1}, \quad (V.2)$$

где  $t_{R1}$  и  $t_{R2}$  — расстояния максимумов этих пиков от точки ввода пробы.

Ширину пика для неразделившихся пиков можно измерять на различной высоте и пользоваться данными, приведенными выше. Погрешность примерно такая же, как и в случае полного разделения.

Показано, что при увеличении степени разделения двух соседних пиков погрешность измерения уменьшается незначительно и близка к погрешности в случае полного разделения компонентов. При этом неполнота разделения компонентов мало сказывается при расчете состава смеси (методом нормировки с учетом коэффициентов стандартизации) при соотношении компонентов, близких к единице.

Используют и другие способы вычисления площади при неполном разделении, например проведение касательных в точках перегиба до пересечения с основанием и определение площадей треугольников, образованных касательными, или опускание перпендикуляра из точки минимума между двумя пиками на нулевую линию и вычисление площади путем умножения высоты этого перпендикуляра на половину ширины каждого пика.

Если ширину пика измерить невозможно, хорошие результаты дает метод измерения величин, пропорциональных площади пика, путем умножения высоты пика на время удерживания компонента ( $t_R$ ) или на объем удерживания ( $V_R$ ):

$$S = h t_R, \quad (V.3)$$

$$S = h V_R, \quad (V.4)$$

причем  $V_R = t_R \omega$ , где  $\omega$  — расход газа-носителя.

Метод обеспечивает малую погрешность анализа, при этом не требуется высокая степень разделения пиков. Погрешность практически не зависит от расхода газа-носителя, мало зависит от температуры и примерно одинакова с погрешностью, получаемой в методе аппроксимации. Однако погрешность этого метода сильно зависит от асимметрии пика и от эффективности разделения:

$$ht_R \approx 0,4S\sqrt{N}, \quad (V.5)$$

где  $N$  — число теоретических тарелок для данного пика.

Малая погрешность более характерна для близких по временам удерживания и форме пиков. В случае искажения формы пика за счет дрейфа нулевой линии во время анализа лучшие результаты дает применение методов непосредственного определения площади. При невозвращении пика на нулевую линию или уходе хвоста пика ниже нулевой линии измерения высоты и площади проводить нельзя ввиду высокой погрешности измерений.

**Измерение площади пика.** Для измерения площади пика применяют интеграторы. Применявшиеся ранее электромеханические интеграторы не получили распространения в связи со сложностью их конструкции, недостаточной надежностью и лишь незначительно меньшей погрешностью по сравнению с ручными методами первичной обработки результатов анализа. Значительно меньшая погрешность достигается при применении электронных цифровых интеграторов с автоматической коррекцией дрейфа нулевой линии и автоматической печатью площади и времени удерживания каждого пика. Эти интеграторы обладают высокой чувствительностью, скоростью счета и позволяют проводить приближенное автоматическое интегрирование частично разделенных пиков. Применение электронного цифрового интегратора делает определение площади пика не зависящим от характеристик регистратора и исключает один из источников погрешностей количественного расчета хроматограмм.

С помощью цифрового интегратора может быть без труда получена погрешность вычисления площади пика 0,1—0,5%, при этом в 10—20 раз сокращается время, необходимое для обработки, например, хроматограммы из 10 пиков. Поэтому, несмотря на достаточно высокую стоимость цифровых интеграторов, их применение окупается за несколько месяцев при 40-часовой рабочей неделе только за счет экономии труда.

Еще лучшие результаты могут быть получены при применении для расчета площадей пиков современной микропроцессорной техники, в том числе микро-ЭВМ, персональных компьютеров и вычислительных комплексов, которые позволяют значительно снизить погрешность измерения и улучшить воспроизводимость за счет точного определения положения нулевой линии в любой момент времени на протяжении всего анализа, программируемой

коррекции дрейфа нулевой линии, фильтрации флуктуационных шумов, аппроксимации формы пика, считая, что она соответствует кривой Гаусса, и т. п.

**Измерение времен удерживания.** Время удерживания каждого компонента смеси может быть измерено вручную с помощью секундомера или по диаграммной ленте регистратора и автоматически с помощью цифрового интегратора. Время удерживания  $t_R$  компонента пробы измеряют в секундах (или мм) от момента ввода пробы до появления максимума пика.

## Глава 2

### ТЕХНИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОБРАБОТКИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ

Изучение разработок ведущих в области хроматографического приборостроения фирм за последние 10 лет определило следующие направления их работ: создание интеграторов; создание хроматографов с автоматизацией функций контроля, управления и обработки данных; разработка специализированных систем (станций) для управления и обработки данных.

В связи с тем, что стоимость серийных мини-ЭВМ и персональных компьютеров непрерывно уменьшается, а также благодаря возможности их использования не только для обработки данных, но и для управления ходом анализа, в хроматографическом приборостроении наблюдается постепенный переход от применения интеграторов к использованию ЭВМ в качестве одного из блоков хроматографа. Особое место занимает применение роботов для проведения лабораторных хроматографических измерений, особенно во вредных условиях труда.

Перечислить здесь все серийно выпускаемые для хроматографии лабораторные интеграторы и компьютеры не представляется возможным из-за их обилия и разнообразия. Однако характеристики, устройство и применение основных и наиболее типичных их представителей будут рассмотрены. Будут рассмотрены также проблемы сбора, обработки, хранения, поиска и интерпретации хроматографических данных. Большая часть информации по этим вопросам поступает вместе с оборудованием от изготовителей и разработчиков аппаратурного и программного обеспечения обработки данных. Потребители, имеющие компьютерное оборудование и опыт в разработке программ, могут разрабатывать программное обеспечение под конкретные требования других потребителей.

Современные системы для обработки данных можно разделить на три основные группы: специализированные регистрирующие

и вычисляющие интеграторы, с жесткой программой интерпретации и вычисления хроматографических данных; стандартные мини-ЭВМ или персональные компьютеры с набором гибких программ, к которым с помощью интерфейсных блоков может подсоединяться один или несколько хроматографов в зависимости от быстродействия и объема памяти вычислительных систем; системы прямой связи хроматографических приборов через интерфейсные блоки с ЭВМ более высокого уровня. Первая группа приборов характеризуется низкой стоимостью, ограниченными возможностями и недостаточной гибкостью. Вторая группа аппаратуры имеет вместе с программным обеспечением более высокий уровень сбора, обработки и контроля данных. Стоимость таких систем выше предыдущих главным образом за счет непосредственного соединения системы с закрепленным хроматографом. Третья группа аппаратного обеспечения обработки данных обладает полными возможностями современных ЭВМ, общая стоимость их значительно больше, однако в расчете на один присоединяемый хроматограф она может быть не выше стоимости оборудования двух предыдущих групп.

## 2.1. ИНТЕГРАТОРЫ

Одними из первых интеграторов для определения площади пика в газовой хроматографии были интеграторы, основанные на электромеханическом принципе интегрирования. Например, применялась система, основанная на использовании инерционного мотора, вращающегося со скоростью, пропорциональной протекающему через него току. Другим электромеханическим интегратором была система, основанная на шарико-дисковом принципе, запись показаний производилась на ленте регистратора. Устройство для интегрирования состояло из шарика, расположенного на плоском вращающемся диске. Шарик вращался со скоростью, пропорциональной его расстоянию от центра диска, которое кинематически зависело от положения пера регистратора. Применяли также аналоговое интегрирование, принцип действия которого был основан на накоплении заряда на интегрирующем конденсаторе. Выходное напряжение на конденсаторе, эквивалентное накопленному заряду, пропорционально площади пика.

В настоящее время электромеханические и аналоговые методы интегрирования практически не применяют в хроматографической практике в связи с развитием и внедрением цифрового электронного интегрирования.

Цифровые интеграторы получили широкое распространение, так как они имеют меньшую погрешность измерения и высокое быстродействие. В них отсутствуют механические узлы, в связи с чем они обладают большей надежностью. Электронные цифровые интеграторы, кроме измерения площади пика, могут опреде-



лять высоту пика и время его выхода, компенсировать постоянный дрейф нулевой линии, определять площади не полностью разделенных пиков, фиксировать плечевые пики, печатать полученные результаты с помощью цифropечатающего устройства на бумажной ленте. Некоторые типы интеграторов имеют устройства для фиксации зашкаленных на регистраторе пиков, которые отмечаются при печати, схемы для исключения пиков растворителей или площадей пиков определенного размера. При этом не печатаются также времена удерживания этих пиков. В состав некоторых интеграторов входят делители выходного сигнала детектора, при этом предусматривается возможность логарифмирования сигнала.

Очевидно, что для определения площади и времени выхода пика должны быть точно определены начало и конец пика, а также его максимум. Это делается с помощью детектора уровня или детектора наклона. Метод детектирования по уровню основан на установке определенного уровня сигнала, превышение которого в результате появления пика отмечается как начало пика, а последующее уменьшение сигнала ниже этого уровня означает конец пика. Этот уровень обычно несколько превышает уровень нулевой линии. Одним из существенных недостатков метода является то, что часть пика ниже установленного уровня не учитывается при интегрировании. Детектор наклона представляет собой логическое устройство контроля начала и конца пика. Схема логического контроля служит также для сообщения корректору дрейфа нулевой линии, что присутствует пик, который не должен быть принят за дрейф нулевой линии. В соответствии с заложенной программой схема логического контроля включает и останавливает счетчик времени удерживания и позволяет определить время от момента ввода пробы до выхода максимума пика. Это время затем печатается вместе с результатом определения площади или высоты пика.

Основной характеристикой детектора наклона является чувствительность к наклону. Для гауссовских пиков высокая чувствительность не столь важна, так как в каждом случае воспроизводимо теряется определенная часть от общей площади пика, особенно если в дальнейшем вычисляется отношение площадей двух пиков. Большинство газохроматографических пиков, однако, не настолько симметричны и, следовательно, требуется высокая чувствительность к наклону, особенно для измерения небольших и широких пиков в конце анализа.

Чувствительность детектора наклона к ложным сигналам может быть уменьшена путем применения схемы с большей постоянной времени. Однако увеличение постоянной времени приводит к увеличению погрешности интегрирования, так как начало и конец пика будут интегрироваться с определенным запаздыванием.

Для реализации цифрового метода детектирования по наклону

необходимо иметь устройство памяти, в котором хранятся данные опроса о наклоне, полученные через малые промежутки времени.

Детектор наклона сравнивает сигнал для каждого интервала времени с предшествующим сигналом и фиксирует начало пика в том случае, если для большинства сравнений отмечен рост сигнала. Обычно в зависимости от типа прибора сумма таких интервалов составляет от 10 до 100. Количество интервалов определяет постоянную времени интегрирования. Если лишь незначительная часть сравнений указывает на рост сигнала, детектор наклона делает вывод о присутствии пиков флуктуаций. При определении площади хроматографического пика интегрирование начинается не с момента последнего сравнения, а с того момента, когда впервые обнаружено увеличение сигнала, так как результаты всех опросов хранятся в памяти интегратора. Таким же способом определяется конец пика. Суммарное время всех опросов должно быть значительно больше времени выхода ожидаемых импульсов шума.

Детектор наклона в отличие от детектора уровня определяет вершину пика, что дает возможность проводить с помощью интегратора также измерение времен удерживания пиков. Детектор наклона позволяет сравнительно легко осуществить интегрирование двух частично неразделенных пиков, в то время как при работе с детектором уровня может быть получена большая ошибка в результате потерь при расчете пиков. В случае плечевых пиков детектор уровня определяет только суммарную площадь двух пиков.

При сильных флуктуациях нулевой линии, связанных, например, с изменениями питания или с уносом неподвижной фазы из колонки, детектирование по наклону дает худшие результаты, так как пики флуктуаций будут отмечены детектором наклона как обычные хроматографические пики. Детектор уровня не обладает таким недостатком. В связи с этим детекторы уровня и наклона иногда объединяют в одном устройстве. Детектор уровня не может отличить начало пика от сильного дрейфа нулевой линии, поэтому уровень должен быть установлен настолько высоко, чтобы он не был превышен в результате дрейфа нулевой линии. В то же время с помощью детектора наклона можно интегрировать пики при наличии постоянного дрейфа нулевой линии.

В современных интеграторах применяют также коррекцию дрейфа и флуктуаций нулевой линии. Для облегчения работы экспериментатора с интеграторами, в которых предусмотрена коррекция дрейфа нулевой линии, делаются соответствующие указания для конкретных случаев разделения в инструкции по эксплуатации или на передней панели интегратора.

Одним из примеров достаточно простого и дешевого интегратора, в котором предусмотрено определение площади пика и времени

удерживания, но не предусмотрена вторичная обработка результатов, является одноканальный электронный цифровой интегратор ИЦ-26 (НРБ). Интегратор ИЦ-26 автоматически детектирует и интегрирует различные по форме пики; корректирует дрейф нулевой линии (диапазон коррекции  $\pm 1$  мВ); автоматически печатает площадь пика (7 цифр) и время удерживания (4 цифры). В интеграторе можно менять границы интегрирования, меняя чувствительность к наклону при оптимальном фильтровании сигнала. Предусмотрено также исключение площадей малых пиков и задерживание интегрирования на определенное время с целью исключения пика растворителя.

Наличие тест-сигнала позволяет проводить проверку и калибровку прибора. Диапазон линейности более  $10^6$ , режим работы автоматический и ручной. В ручном режиме время удерживания не печатается. На ленте регистратора автоматически отмечаются начало и конец интегрирования.

На рис. V.2 приведена блок-схема прибора. После входного усилителя 6 сигнал идет двумя путями: первый — через логарифмический

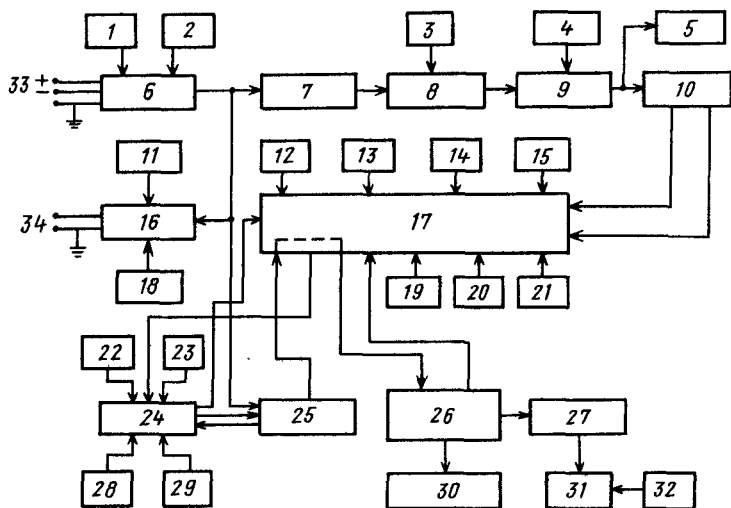


Рис. V.2. Блок-схема цифрового интегратора ИЦ-26:

1 — шунт входа; 2 — калибровочный тест; 3 — задатчик диапазона частот пропускания («фильтр»); 4 — задатчик чувствительности; 5 — задатчик уровня наклона («наклон»); 6 — входной усилитель; 7 — логарифмический усилитель; 8 — фильтр; 9 — дифференцирующий усилитель; 10 — детектор наклона; 11 — переключатель линейной или логарифмической записи; 12 — включение автоматики; 13 — включение ручного контроля; 14 — включение плечевого детектора; 15 — смещение нулевой линии; 16 — выход на регистратор; 17 — схема логики; 18 — индикатор нуля; 19 — задатчик времени задержки интегрирования (0—990 с); 20 — задатчик исключения площади (0—990 ед. площади); 21 — задатчик наклона и чувствительности к наклону; 22 — плавающая настройка корректора; 23 — корректор дрейфа нулевой линии; 24 — преобразователь «напряжение — частота»; 25 — блок регистрации времени и площади; 26 — блок управления цифрочечаткой; 27 — блок индикаторов; 28 — цифрочечатка; 29 — кнопка ручного передвижения ленты цифрочечаточного устройства; 30 — вход интегратора; 31 — выход на регистратор

мический усилитель 7, активный фильтр 8 и дифференциатор 9 к детекторам положительного и отрицательного наклона 10; второй — к преобразователю «напряжение — частота» 25. Вторым сигналом, кроме того, может через делитель напряжения 18 подаваться на регистратор 16. Импульсы преобразователя 25, сигналы детектора наклона 10 и команды управления 12—15, 19—21 обрабатываются схемой логики 17 и выдаются на блок цифровой информации 26.

Корректор дрейфа нулевой линии 24 регистрирует во времени различие между заданным в интеграторе положением нулевой линии и реальным уровнем нулевой линии, корректируя его, когда пик не интегрируется.

С помощью регуляторов «фильтр» 3 и «наклон» 5 интегратор настраивается в зависимости от формы пиков.

Одним из перспективных направлений является внедрение вычисляющих электронных интеграторов, которые кроме определения площади и времени удерживания пиков могут проводить вычисление состава смеси с учетом коэффициентов стандартизации и некоторые другие операции. По требованию потребителей в некоторых моделях интеграторов предусмотрено измерение и печатание высот пиков.

Выпускаются многоканальные интеграторы, которые могут обрабатывать сигналы от нескольких хроматографов или детекторов одновременно.

Примером одноканального микропроцессорного электронного специализированного интегратора, предназначенного для точной обработки результатов хроматографического анализа независимо от типа детектора и полярности входного сигнала, является вычисляющий интегратор Интерхром-1 (НРБ). Интегратор может измерять площади и времена удерживания пиков, проводить разрешение не полностью разделенных пиков, определять концентрации компонентов в смеси и проводить их идентификацию. Кроме того, в интеграторе имеется возможность программированного управления работой автоматических дозаторов и переключением потоков в схеме хроматографа с числом каналов управления до 8, числом задаваемых команд до 80 и интервалом между командами не менее 1 с. Предусмотрено подключение к интегратору «Интерхром-1» аналогового регистратора с отображением хроматограмм в линейном или логарифмическом масштабе с коэффициентами деления от 1 до 1024.

Интегратор также производит следующие операции: исключает пики малой площади по заданному порогу площади; исключает части хроматограммы по времени; автоматически аппроксимирует нулевую линию по огибающей кривой; автоматически разделяет пики по методам касательной или перпендикуляра; проводит разделение групп «пиков — наездников» и формирование нулевой линии в точку в заданные оператором моменты времени.

Входной сигнал интегратора от  $-0,001$  до  $+1,0$  В; линейный диапазон —  $10^6$ ; чувствительность —  $1,0$  Гц/мкВ; частоты опроса —  $20$  Гц; число анализируемых пиков —  $\leq 250$ ; входное сопротивление — около  $10$  МОм.

Практически все современные интеграторы конструктивно выполнены в виде моноблока и обычно содержат следующие узлы: алфавитно-цифровую и функциональную клавиатуру; печатающее устройство с возможностью отображения графической информации; аналого-цифровые преобразователи (АЦП) с высоким входным сопротивлением и линейным диапазоном не менее  $10^6$ ; современный мини-компьютер.

Типичным представителем современных интеграторов является интегратор модели ICR-1B фирмы «Intersmat Instruments» (США), который может выполнять следующие операции: определяет времена выхода, площади и высоты до  $339$  пиков; автоматически или вручную задает параметры обработки; выдает информацию о «пиках-наездниках» и методе разделения пиков; исключает из отчета не представляющие интерес пики; проводит группирование пиков; производит различные типы вторичной количественной обработки хроматограмм; дает линейаризацию экспоненциального сигнала пламенно-фотометрического детектора; проводит градуировку по двум точкам с усреднением результатов нескольких анализов и возможностью автоматической коррекции времен удерживания; исключает результаты недостоверной градуировки; хранит в энергонезависимой памяти до  $8$  файлов; проводит идентификацию компонентов по абсолютным или относительным временам удерживания с учетом установленных границ их изменения; распечатывает дату и время анализа, хроматограммы с отметкой начала, конца интегрирования и времен удерживания пиков, результаты обработки с наименованием идентифицированных компонентов.

Значительно большими возможностями обладают интеграторы, имеющие встроенную оперативную память для хранения хроматограмм. Примером может служить двухканальный интегратор ENICA 21 фирмы «Delsi Instruments» (Франция), имеющий до  $128$  К памяти и интерфейс RS-232C. Интегратор обеспечивает следующие дополнительные возможности: вторичный расчет хроматограмм по различным методикам; вычитание уровня нулевой линии, значение которого получено при проведении «холостого» анализа; градуировку на четырех уровнях; распечатку хроматограммы и нулевой линии; выдачу до  $9$  временных команд на внешние устройства; трансляцию данных на ЭВМ более высокого уровня; распечатку текущих параметров хроматографа; связь с устройством автоматического ввода пробы; проведение самодиагностики.

Японская фирма «Shimadzu» специально для хроматографии выпускает два типа самопишущих микропроцессорных устройств обработки данных: достаточно простое для рутинных анализов модели «Хроматопак С-RIВ» и более сложное с дисплеем модели «Хроматопак С-R2А». В модели С-RIВ предусмотрена печать на термочувствительной бумаге и запись хроматограмм на графопостроителе; печать наименований пиков; обработка до 339 пиков на хроматограмме; линейаризация сигнала для нелинейных детекторов; полностью автоматизированный анализ по временной программе и изменение параметров в ходе анализа; измерение высоты, площади и времени удерживания пиков; точная калибровка на основе получения коэффициентов чувствительности; собственная диагностика неисправностей; воспроизводимая обработка различных по форме пиков, в том числе узких (шириной до 0,2 с), «плечевых», не полностью разделившихся, при сильном шуме и дрейфе нулевой линии; воспроизводимая идентификация пиков по абсолютным или относительным временам удерживания; вычисление количественного состава смесей методами нормализации, внутреннего стандарта, абсолютной и экспоненциальной калибровки; исключение не представляющих интерес и отрицательных пиков; повторение вычислений в любой момент времени и некоторые другие операции.

Блок обработки данных «С-R2А» наряду с перечисленными выше возможностями имеет более высокую скорость вычислений, большую емкость памяти, он снабжен операционным и графическим дисплеем, может одновременно записывать и обрабатывать выходные сигналы двух детекторов (хроматографов). Блок позволяет оперативно контролировать работу как газовых, так и жидкостных хроматографов; обрабатывать и вычислять параметры до 1900 пиков; обеспечивает широкий набор программ обработки, в том числе статистическую обработку данных; имеет встроенную систему охраны запасенных в памяти данных при выходе из строя системы питания.

Специально для обеспечения работы современного жидкостного хроматографа американская фирма «Labor. Data Control» разработала систему ССМ, основанную на микропроцессорном контроле и регулировании параметров с одновременной регистрацией сигналов и рабочих параметров двух детекторов на дисплее и двухканальном графопостроителе. Более 100 параметров жидкостного хроматографа можно ввести в систему в цифровой форме с пульта управления. При круглосуточной работе параметры могут быть записаны на кассету встроенного магнитофона. Дисплей и графопостроитель работают независимо, что позволяет оператору проводить необходимые вычисления, не прерывая работу хроматографа. В жидкостной хроматографии система обеспе-

чивает изократическую и градиентную работу; контроль и регулирование расхода элюента от 0,1 до 10 мл/мин с дискретностью 0,001 мл/мин; выбор от 1 до 4-х растворителей, программируемое переключение до 2-х колонок; контроль и регулирование давления элюента в диапазоне 0—42 МПа; контроль текущего времени в диапазоне 1—999,9 мин; переключение масштабов детектирования от 1 до 512 по временной программе; программируемый выбор длины волны детектирования в диапазоне 190—350 нм; контроль скорости диаграммной ленты в диапазоне 5—500 см/мин; регулирование и контроль температуры колонки от комнатной до 60 °С; контроль работы автоматического дозатора жидких проб; вычисление площадей пиков и времен удерживания; коррекцию дрейфа и уровня нулевой линии; вычисление коэффициентов чувствительности; определение состава смеси методами вычисления содержания компонентов по площадям пиков (в %), нормализации внутреннего и внешнего стандартов.

Система имеет постоянную память 32 К, интерфейс для связи с внешней ЭВМ более высокого уровня, по два независимых аналоговых входа и выхода и контроль до шести внешних контактов типа переключателей или реле.

Четырехканальная система обработки данных «Виста-401» фирмы «Varian» (США) позволяет обрабатывать данные любых типов хроматографов и автоматизировать их работу одновременно. Система имеет достаточно большую оперативную память и дополнительную встроенную память на 2-х плоских дисках по 90 К каждый. Это позволяет проводить вычисление дрейфа нулевой линии и перепостроение хроматограмм без дрейфа нулевой линии. Система имеет также встроенный двухканальный графопостроитель. С целью полной автоматизации процесса хроматографического анализа система «Виста-401» может объединяться с четырьмя газовыми или жидкостными хроматографами, причем и газовые и жидкостные хроматографы могут объединяться в единой системе с «Виста-401».

Кроме того, система «Виста-401» может управлять и контролировать работу до 4-х автоматических дозаторов пробы. Встроенный дисплей позволяет не только контролировать рабочие параметры хроматографов в реальном времени, но и строить новые или редактировать старые программы одновременно с записью результатов анализа на графопостроителе. Система имеет выходы на внешние большие и мини-ЭВМ. Двухканальный графопостроитель дает полные хроматограммы со всеми необходимыми надписями, итоговые протоколы расчета данных с указанием погрешности и типов методов вычисления.

Быстрая печать (90 линий/мин и 120 образов/с) позволяет с высокой точностью определять времена удерживания, в том числе в капиллярной хроматографии, и печатать времена удерживания и названия пиков на ленте графопостроителя. Кроме перечисленных

выше функций, система «Виста-401» выполняет все стандартные операции по обработке хроматографических данных. Опубликовано, например, что применение системы обработки данных «Виста-401» в сочетании с программируемой системой типа «Виста-Плюс», специально разработанной для массовых потребителей, позволяет получить огромное количество данных о параметрах и результатах хроматографического анализа.

Ряд зарубежных фирм выпускает универсальные комплекты системы для автоматизации вычисления данных в аналитических лабораториях, хранения и обработки данных, поступающих от различных аналитических приборов. Такие системы позволяют более эффективно обрабатывать данные лабораторных анализов и снижают стоимость в расчете на одну анализируемую пробу. В сочетании со стандартными мини-ЭВМ с их помощью можно контролировать работу автоматизированных хроматографов, автоматических дозаторов проб и других устройств, а также поддерживать связь с ЭВМ более высокого уровня и с дополнительной памятью.

Наиболее высокой по уровню в ряду систем, основанных на персональных компьютерах, стоит система обработки данных фирм «Nelson Analytical» (США) модели 3000. Основанная на применении персонального компьютера фирмы «IBM» (США) модель 3000 является наиболее прогрессивным на сегодняшний день устройством для обработки данных. По сравнению с системой фирмы «Apple» она более сложная и дорогая. Система обладает дополнительной возможностью цветного графического отображения информации на дисплее высокого разрешения. С помощью системы модели 3000 оператор может получить данные от 6 хроматографов, каждый из которых оснащен двумя детекторами и автоматическим дозатором, и одновременно выполнять автономные программы, не связанные с процессами хроматографического разделения. Во время выполнения программы интерфейс сохраняет необработанные данные в буферной памяти до окончания анализа. Затем данные со всех каналов передаются в память компьютера, предварительно обрабатываются, выдаются в табличной форме и сохраняются на дисках для последующего использования. Хроматографическое программное обеспечение в системе модели 3000 осуществляет также выдачу нестандартного отчета и создание методики. Система может провести повторный анализ с использованием других параметров. При новых параметрах эксперимента можно получить повторную хроматограмму, а с помощью имеющегося программного обеспечения сравнить хроматограммы путем их наложения, провести расчет соотношения параметров и различий в хроматограммах. Для облегчения визуализации на одном дисплее можно обработать до 8 хроматограмм с вертикальным и (или) горизонтальным масштабированием. Несмотря на то что система модели 3000 несколько дороже других, она



является перспективной для комплектных хроматографических лабораторий с точки зрения гибкой обработки данных и для мульти-детекторных хроматографических систем.

Тщательное и многостороннее изучение вопросов применения отечественной вычислительной техники для автоматизации обработки данных, проведенное СКБ АН Эстонской ССР, показало, что удовлетворение всей совокупности перечисленных выше требований к компьютерам для хроматографических целей возможно только при использовании персональных ЭВМ серии ДВК и только таких модификаций, которые имеют как минимум следующее обеспечение: черно-белый графический дисплей; универсальную клавиатуру с большим набором функциональных клавиш; устройство печати с возможностью вывода графической информации; устройство внешней памяти на гибких магнитных дисках, позволяющее осуществлять обмен информацией в реальном масштабе времени; быстрое действие не менее 500 тысяч операций в секунду типа регистр — регистр; команды плавающей арифметики.

Перечисленным выше требованиям полностью удовлетворяют микро-ЭВМ ДВК-3М2 и более современные модели типа ДВК-4.

Применение таких ЭВМ позволяет реализовать следующие функции: осуществить диалог с оператором в максимально «дружественной» форме с применением системы подсказок; отобразить на дисплее наиболее важную информацию; провести контроль параметров при создании и изменении методики анализов; получить полную информацию о состоянии узлов хроматографа; осуществить хранение библиотеки методик, градуировочных данных и хроматограмм; управлять работой хроматографа, в соответствии с заданной методикой анализа; проводить программирование температуры термостата колонок и расхода потока подвижной фазы по заданному закону; повысить точность поддержания параметров за счет использования усложненных алгоритмов регулирования; осуществить контроль соотношения истинных и заданных значений параметров; проводить диагностику неисправностей и их обнаружение; предотвращать выход из строя хроматографа в аварийных ситуациях; проводить обработку хроматографических сигналов анализа по различным методикам; проводить коррекцию нулевой линии вручную и автоматически; проводить градуировку всех каналов хроматографа в автоматизированном режиме для каждого целевого компонента при различных концентрациях этого компонента с возможностью усреднения результатов нескольких градуировок; проводить достоверную идентификацию целевых компонентов пробы путем распознавания образов и при использовании многомерной хроматографии.

При применении серийных компьютеров более высокого уровня ЭВМ, кроме обработки данных, может взять на себя функции следующих электронных блоков хроматографа: регуляторов температуры, программаторов температуры, расхода и давления под-

вижной фазы, блоков управления дозаторами и коллекторами фракций; программаторов анализа. ЭВМ может контролировать все режимные параметры хроматографа, защищать различные объекты прибора от превышения давления и температуры, коротких замыканий и других неисправностей.

ЭВМ вычисляет относительные времена удерживания с поправкой на время удерживания несорбирующегося компонента. Полученные относительные значения времен удерживания могут быть сопоставлены со стандартными значениями с целью предварительной идентификации компонентов. Значения площадей пиков, хранящихся в памяти ЭВМ, могут быть подвергнуты различным математическим преобразованиям, таким как умножение значений площадей пиков на калибровочные коэффициенты; суммирование площадей и вычисление относительной доли каждого пика; вычисления по методу внутреннего стандарта. Данные о степени симметричности пика, величинах ВЭТТ, коэффициентах разделения и других хроматографических характеристиках также могут быть получены с помощью ЭВМ.

Соединение хроматографического детектора с ЭВМ позволит, например, устранить лишние стадии стабилизации сигналов, уменьшить шумы, провести автоматическое переключение масштабов делителей сигнала, увеличить отношение сигнала к шуму, изменить селективность детектирования и т. п.

ЭВМ уже используют для калибровки детекторов, а также для вычисления и запасаения данных, необходимых для калибровки. При этом динамическая область детектора может быть расширена в нелинейную область. Соединение калиброванных температурных датчиков с ЭВМ может значительно уменьшить погрешность регулирования температуры. На выходе ЭВМ можно получать запись хроматографических параметров, таких как напряжение, температура, расход потока, давление и др.

Гибкость и простота работы с ЭВМ обеспечиваются разработкой программ, доступных для большинства хроматографистов. Если необходимы специальные вычисления, экспериментатору дается возможность самому составлять дополнительные программы работы, причем процесс программирования должен быть достаточно простым.

Разработаны устройства для перевода напечатанного на пишущей машинке текста на язык ЭВМ. Проводятся исследования по вводу информации и общению с ЭВМ с помощью голоса. В будущем это позволит значительно упростить специальные знания, необходимые экспериментатору для составления программы взаимодействия хроматографа с ЭВМ. Результаты хроматографических анализов при этом значительно улучшатся за счет автоматического выбора оптимальных аналитических параметров, улучшения точности, воспроизводимости и разрешения хроматографических методик.

С автоматическим интеллектуальным хроматографом будет легче работать, причем он будет обладать большей гибкостью, чем используемые в настоящее время приборы. Из сказанного следует, что полная автоматизация хроматографических приборов является делом недалекого будущего, причем она обеспечит как непрерывную работу хроматографов, так и автоматическую обработку значительного объема информации, получаемой в результате каждого анализа. Однако необходимая и достаточная степень автоматизации будет зависеть от размеров и назначения каждой конкретной лаборатории.

Применение вычислительных машин с их возможностями накопления, переработки и выдачи огромного количества данных решает многие проблемы, связанные с обработкой большого количества информации. Использование ЭВМ — ступень в развитии хроматографического приборостроения. По скорости решения счетных задач компьютер почти в миллион раз превосходит механические устройства или мозг человека. Во всех областях деятельности человека вычислительные машины облегчают работу предприятий и организаций и закладывают основу для их дальнейшего развития. Преимущества, достигаемые с применением ЭВМ, показывают, что вычислительная техника будет проникать в новые области исследований. Поэтому дальнейшие успехи хроматографии невозможны без применения ЭВМ.

### *Глава 3*

## **МЕТОДЫ И МЕТРОЛОГИЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ИЗМЕРЕНИЙ**

По определению И. Новака [100], термин «метод количественного хроматографического анализа» следует понимать как методику, которой следует придерживаться при проведении следующих четырех операций: 1) отбора и подготовки проб перед их вводом в хроматограф; 2) ввода пробы, процесса хроматографирования и регистрации хроматограммы; 3) измерения количественных параметров хроматографической записи; 4) интерпретации полученных данных. К этому надо добавить еще одну важнейшую операцию — градуировку хроматографа.

Возможные пути реализации каждой из этих стадий определяются совокупностью достаточно разнородных факторов, а именно: поставленной аналитической задачей, нормами точности измерений, характеристиками используемого оборудования, чистотой необходимых для разбавления проб растворителей, доступностью и квалификацией стандартных образцов для градуировки или заменяющих их химических реактивов.

В литературе для согласования и решения всей совокупности

факторов рекомендуется использовать системный многоуровневый подход [101], в котором задача определения  $i$ -го компонента (группы соединений) в  $j$ -м интервале его содержаний в  $k$ -м веществе по  $l$ -й методике на  $m$ -м аналитическом приборе  $n$ -м аналитиком определяется как элементарное звено генеральной информационно-измерительной системы. Отличительной особенностью и достоинством системного подхода являются сосредоточение внимания на целях системы верхнего уровня, а также учет всех существенных связей и ограничений.

Методология такого подхода предусматривает выполнение определенной последовательности действий, которые необходимы для реалистического суждения о качестве и эффективности анализируемой или разрабатываемой системы и для поиска путей ее совершенствования.

Каждое элементарное звено (модуль) системы, в свою очередь, складывается из подзвеньев, большая часть которых применительно к количественному хроматографическому анализу рассмотрена в предыдущих главах. В настоящей главе остановимся на заключительном этапе анализа — непосредственном получении количественных результатов и способах оценки их погрешностей. Вначале кратко рассмотрим характеристики погрешности методик выполнения хроматографических измерений.

Хроматографический анализ, как частный случай химического анализа, с позиций метрологии есть измерение химического состава веществ. Его специфика как метрологической процедуры состоит в следующем.

1. Хроматографическому измерению должны предшествовать или сопутствовать этапы идентификации и градуировки.

2. Само измерение является косвенным, так как измеряется непосредственно не число частиц того или иного вида, а некие физические параметры, пропорциональные массе.

3. При хроматографическом анализе измеряется состав многокомпонентных систем, поэтому измерения состава осложняются эффектами взаимного влияния компонентов, что выражается в частичном наложении и перекрывании пиков нескольких компонентов. В результате хроматографические измерения отягощены погрешностями обычно тем более значительными, чем сложнее состав анализируемой пробы. Отсюда же вытекает принципиальная невозможность приготовления единого стандартного образца на заданный компонент безотносительно к остальному составу анализируемой пробы.

Получили распространение несколько вариантов классификации погрешностей измерений: 1) по способу выражения (абсолютные и относительные); 2) по характеру причин, которые их вызывают (случайные, систематические и промахи), 3) по источникам происхождения (инструментальные, реактивные, методические, пробоподготовки и др.).

Качество измерений характеризуется точностью, сходимостью, воспроизводимостью и правильностью результатов измерений.

\* Точность — качество измерений, отражающее близость результатов измерений к истинному значению. Сходимость — качество измерений, отражающее близость друг к другу результатов измерений, выполняемых в одинаковых условиях (т. е. по одной и той же методике, в одной лаборатории, одним или несколькими исполнителями, на одном комплекте средств измерений, в возможно короткое время, при близких значениях внешних влияющих факторов и мешающих компонентов). Воспроизводимость — качество измерений, отражающее близость друг к другу результатов измерений, выполняемых в различных условиях (в разных лабораториях, в разное время, различными средствами). Правильность — качество измерений, отражающее близость к нулю систематических погрешностей.

Наиболее полной характеристикой точности выполняемых по данной методике измерений является суммарная погрешность результата измерений. Она нормируется пределами допускаемого значения суммарной погрешности результата измерения. Эти пределы устанавливают симметричный интервал, соответствующий истинному значению суммарной погрешности результата измерения.

Нормируемым показателем оперативного контроля сходимости является допускаемое расхождение между результатами параллельных определений, выполненных в одинаковых условиях.

При измерениях с многократными наблюдениями, к которым относятся хроматографические методы, в методиках выполнения измерений, таким образом, нормируются два основных показателя: пределы допускаемого значения суммарной погрешности результата анализа и допускаемое расхождение между результатами параллельных определений.

В самом общем виде суммарная погрешность результата измерений складывается из случайной и систематической составляющих. Источниками погрешностей результатов хроматографических измерений являются факторы, которые можно разбить на три группы: 1) поддающиеся количественной оценке; 2) не поддающиеся количественной оценке; 3) неизвестные. Если исключить грубые промахи, то в хроматографии имеют место следующие причины возникновения погрешностей: возможная неоднородность анализируемой пробы; невозможность работы системы дозирования; потеря части пробы (негерметичность разделительной системы, потери в дозаторе, необратимая адсорбция, каталитические превращения, деструкция); образование «ложных» пиков («память» шприца, мембраны испарителя или других частей аппаратуры, реакция на броски давления при переключении кранов, эффект режимов градиентного элюирования, программирования температуры или давления); колебания условий разде-

ления (нестабильность газовых потоков и температуры термостатируемых узлов); колебания условий внешней среды (температура, барометрическое давление); нестабильность частоты и напряжения электрического питания; ограниченная точность средств регистрации и обработки данных.

Разработчик методики анализа должен выявить возможные источники погрешностей, исключить те систематические погрешности, которые могут быть исключены, и оценить случайные и неисключенные систематические погрешности.

Для оценки случайной составляющей погрешности измерения необходимо получить исходные статистические данные путем проведения многократных наблюдений по одной и той же методик анализа во всем диапазоне измеряемых величин, при фиксируемых значениях внешних влияющих факторов. Схемы статистической обработки экспериментальных данных подробно описаны в литературе [102—104]. Выбор конкретной схемы обработки определяется особенностями, назначением и областью применения методики.

При статистической обработке исходных данных вводят два допущения: 1) предполагают, что результаты наблюдений не противоречат гипотезе о нормальном распределении и взаимно независимы; 2) методы обработки результатов прямых измерений распространяют на обработку хроматографических данных, которые, как уже указывалось, являются результатами косвенных измерений.

Случайная составляющая погрешности результата измерения нормируется значением среднего квадратического отклонения результата измерения при данном числе параллельных определений.

Неисключенные систематические погрешности могут складываться из неисключенных систематических погрешностей метода, средств измерений, экспериментатора, а также составляющих, обусловленных влиянием внешних воздействующих физических величин и мешающих компонентов. Так, установлено, что при хроматографическом анализе реактивов наиболее значимы неисключенные систематические погрешности градуировки. Они вызваны неполной идентификацией, невозможностью экспериментального определения градуировочных коэффициентов отдельных анализируемых компонентов, неточностью расчетных методов оценки градуировочных коэффициентов.

При разработке методики анализа систематические погрешности неизвестной природы сводят к минимуму с помощью приема релятивизации, который предполагает проведение анализа относительно другого объекта. Наличие субъективной систематической погрешности может быть оценено статистически после применения приема рандомизации, когда эти систематические погрешности представляются в виде случайных величин. С этой целью измерения выполняются несколькими операторами по одной методике в одинаковых условиях.

Систематическая погрешность может быть выявлена и оценена одним из следующих методов: 1) применением стандартных образцов состава; 2) использованием приема удвоения в сочетании с методом добавок; 3) сравнением результатов измерений состава анализируемой пробы, полученных по двум методикам, одна из которых метрологически аттестована.

Неисключенная систематическая погрешность, нормируемая пределами допускаемого значения систематической составляющей погрешности, может быть оценена расчетным методом, путем постадийного выявления ее слагаемых.

Однако могут быть и недетерминированные случайные составляющие систематической погрешности. Для их надежной оценки требуется проведение межлабораторных экспериментов для получения достаточно представительных выборок результатов анализа или знание всех действующих факторов, распределение их значений и зависимостей аналитического сигнала от этих значений для вычисления границ неисключенных систематических погрешностей. Следует подчеркнуть, что оценка неисключенной систематики — нетривиальная процедура и требует от метрологов и аналитиков при метрологической аттестации каждой методики творческого подхода. Способы оценки суммарной погрешности результата измерений и ее составляющих будут изложены ниже применительно к конкретным методам количественного анализа, к рассмотрению которых мы и перейдем.

### 3.1. АБСОЛЮТНАЯ ГРАДУИРОВКА

Суть метода абсолютной градуировки состоит в прямом сравнении площади (высоты) пика анализируемого вещества в исследуемой пробе неизвестного состава с площадью (высотой) пика того же вещества в пробе известного ( $X_i$ ) состава. Для его реализации оценивают возможный интервал измеряемых концентраций (или абсолютных количеств) анализируемого вещества,

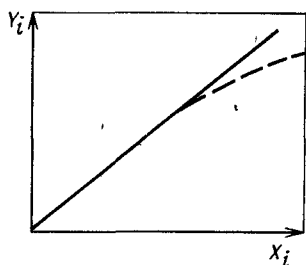


Рис. V.3. Виды градуировочной зависимости выходного сигнала хроматографа ( $Y_i$ ) от входного сигнала — концентрации или абсолютного содержания определяемого вещества ( $X_i$ )

готовят набор равномерно распределенных по этому концентрационному интервалу смесей с аттестованной величиной  $X_i$ , каждую смесь хроматографируют и определяют в соответствии с методикой выполнения измерений значение выходного сигнала хроматографа для анализируемого вещества ( $Y_i$ ); полученную совокупность пар значений входного  $X_i$  и выходного  $Y_i$  сигналов используют для построения градуировочной

зависимости (рис. V.3); затем хроматографируют смесь неизвестного состава, определяют выходной сигнал  $Y_i$ , для анализируемого вещества и с помощью градуировочного графика находят искомую величину  $X_i$ .

Возможно градуировку хроматографа в заданном диапазоне измерений проводить не по смесям с различным содержанием компонента, а по индивидуальному веществу в условиях варьирования объема дозы. В общем виде градуировочная зависимость  $Y=f(X)$  может быть как линейной, так и нелинейной, хотя, как правило, она линейна, и ее аппроксимируют уравнением вида

$$Y=a+bX,$$

где  $a$  и  $b$  — коэффициенты регрессии, подлежащие оценке в процессе градуировки.

Если прямая проходит через начало координат, расчеты существенно упрощаются. Рекомендуется построение градуировочной зависимости по экспериментальным данным осуществлять методом наименьших квадратов.

Когда функция  $Y=f(X)$  линейна, после определения углового коэффициента  $b$  массовую долю анализируемого вещества можно вычислить по формуле:

$$X_i=(bY_i/Q) \cdot 100,$$

где  $Q$  — объем ( $\text{см}^3$ ) или масса (г) газообразной или жидкой пробы

При реализации метода абсолютной градуировки важно, чтобы градуировка и измерения проводились в строго одинаковых условиях. Наиболее существенными факторами являются точность и воспроизводимость дозирования пробы. Условия хроматографирования (включая режим работы детектора) и обработки результатов также должны быть идентичными.

Всесоюзным научно-исследовательским институтом метрологической службы разработаны документы (МИ — 137—77 и МИ — 640—84 — Методические указания по аттестации методик выполнения хроматографических измерений), которые устанавливают порядок аттестации методик выполнения хроматографических измерений по методу абсолютной градуировки. Рассмотрим более подробно подходы, изложенные в этих документах.

При выполнении хроматографических измерений методом абсолютной градуировки погрешность измерений можно оценить величиной  $\Delta_X$ :

$$\Delta_X=2 \cdot 100 \sqrt{\frac{1}{4} (\delta_{\text{гр}})^2 + \frac{1}{3} \theta_m^2 + s_Y^2 + \sum s_i^2},$$

где  $\Delta_X$  — доверительная граница суммарной относительной погрешности результата измерения при  $P=0,95$ ,  $\delta_{\text{гр}}$  — доверительная граница погрешности градуировки, т. е. погрешность аппроксимации градуировочного графика;  $\theta_m$  — сумма неисключенных систематических погрешностей, связанных с методическими погрешностями и изменениями градуировочной характеристики;  $s_Y$  — относительное среднее квадратическое отклонение выходного сигнала, найденное в процессе



аттестации методики;  $\sum s_i$  — сумма составляющих погрешности результата измерений, обусловленных влиянием внешних воздействующих физических величин.

Хроматограф градуируют в заданном диапазоне измерений либо по аттестованным смесям с различным содержанием компонентов, либо по чистым веществам с использованием аттестованных дозаторов.

Для градуировки на вход хроматографа  $n$  раз ( $n \geq 3$ ) подают градуировочную смесь с содержанием анализируемого компонента  $X_i$  или определенную дозу чистого вещества ( $V_i$ ) и измеряют  $n$  значений выходного сигнала  $Z_i$ . Операцию повторяют для всех  $m$  градуировочных смесей дозаторов. Значения  $Y_i$  рассчитывают по средним значениям выходного сигнала. Градуировочную характеристику аппроксимируют линейной функцией вида

$$Y = a + bX.$$

Коэффициенты регрессии  $a$  и  $b$  вычисляют по формулам:

$$a = (\sum P_i X_i^2 \sum P_i Y_i - \sum P_i X_i \sum P_i X_i Y_i) / [m \sum P_i X_i^2 - (\sum P_i X_i)^2];$$

$$b = (m \sum P_i X_i Y_i - \sum P_i X_i \sum P_i Y_i) / [m \sum P_i X_i^2 - (\sum P_i X_i)^2],$$

где  $P_i$  — коэффициент, учитывающий различие в погрешности аттестации градуировочных смесей или в погрешности аттестации дозирующих объемов и обратно пропорциональный квадрату погрешности аттестации  $j$ -й смеси (дозирующего объема)

Если погрешность аттестации всех градуировочных смесей (дозирующих объемов) одинакова, то  $P_i = 1$ .

Доверительную границу погрешности градуировки оценивают по формуле:

$$\delta_{rp} = 2 \sqrt{(s_X^2/X^2) + (1/3) \delta_c^2},$$

где  $\delta_c$  — значение относительной погрешности аттестации смеси для градуировки,

$$s_X = s_0/b \sqrt{1 + (1/m) + [m(Y - \bar{Y})^2/b^2] / [m \sum X_i^2 - (\sum X_i)^2]}, \quad \bar{Y} = \sum Y_i/m,$$

$$s_0 = \sqrt{(\sum Y_i^2 - a \sum Y_i - b \sum X_i Y_i) / (k - 2)}, \quad k = mn.$$

Сумму составляющих погрешности, обусловленных влиянием внешних воздействующих физических величин, вычисляют следующим образом:

$$\sum s_i^2 = (\sum_{i=1}^N s_{Ti}^2) + s_q^2 + s_p^2 T + s_q^2 T + s_q^2 P,$$

где  $s_{Ti}$  — составляющая погрешности от нестабильности температуры  $i$ -го из  $N$  термостатируемых блоков;

$$s_{Ti} = K_{Ti} / 2\sqrt{3} (\delta_{Ti}^+ - \delta_{Ti}^-),$$

где  $K_{Ti}$  — коэффициент влияния изменения температуры  $i$ -го термостатируемого блока на погрешность измерений;  $s_q$  — составляющая погрешности от нестабильности расхода газов:

$$s_q = K_{qi} / 2\sqrt{3} (\delta_q^+ - \delta_q^-),$$

где  $K_{q_i}$  — коэффициент влияния изменения расхода газа-носителя и вспомогательных газов на погрешность измерений

Аналогичным образом находят составляющие погрешности от изменений плотности при изменении температуры окружающего воздуха  $s_{qT}$ , от нестабильности расхода, вызванной изменениями температуры окружающего воздуха  $s_{qT}$ , от нестабильности расхода, вызванной изменениями барометрического давления  $s_{qP}$ .

В случае контроля значений внешних влияющих величин (температуры окружающего воздуха и барометрического давления) в процессе выполнения хроматографических анализов и внесения заранее установленных поправок в результаты измерений соответствующие составляющие погрешности будут определяться погрешностями средств контроля и могут не учитываться при расчетах  $\Delta x$ .

С целью определения коэффициентов влияния  $K_{T_i}$ ,  $K_{q_i}$  каждого из факторов на погрешность измерений необходима постановка специальных опытов с использованием методов планирования эксперимента. Для каждого фактора выбирают три уровня значений:  $Q_i^0$ ,  $Q_i^+$  и  $Q_i^-$ , обеспечивающих выполнение следующих условий:

$$|(Q_i^+ - Q_i^0)/Q_i^0| \geq 3s_y,$$

$$|(Q_i^- - Q_i^0)/Q_i^0| \geq 3s_y$$

Измеряют среднее значение выходного сигнала  $Y_{Q^0}$  в режиме градуировки при  $Q_i^0$ . Затем устанавливают значения факторов, соответствующие нижнему уровню  $Q_i^0$ , и получают значение выходного сигнала  $Y_Q$ . В последующих измерениях поочередно значения каждого из факторов устанавливают на верхнем уровне  $Q_i^+$  и получают соответствующие значения  $Y_i$ . На основании полученных результатов рассчитывают значения коэффициентов влияния:

$$K_Q = |(Y_{Q^+} - Y_{Q^-})/Y_{Q^0} (Q^+ - Q^-)|$$

### 3.2. МЕТОД ВНУТРЕННЕГО СТАНДАРТА

Метод внутреннего стандарта основан на сопоставлении измеряемого параметра хроматографического пика  $P_i$  (площади, высоты или произведения высоты на время удерживания) определяемого вещества с аналогичным параметром  $P_{ст}$  добавляемого в известном количестве к пробе не содержащегося в ней вещества сравнения, называемого внутренним стандартом. Массовую долю определяемого вещества  $X_i$  (в %) определяют по формуле:

$$X_i = P_i K_i m_{ст} \cdot 100 / (P_{ст} m_{пр}), \quad (V 6)$$

где  $K_i$  — градуировочный коэффициент определяемого вещества по внутреннему стандарту,  $m_{ст}$  — навеска добавленного к пробе внутреннего стандарта, г,  $m_{пр}$  — навеска анализируемой пробы без добавки стандарта, г

Поскольку сопоставление величин  $P_i$  и  $P_{ст}$  осуществляется в рамках одной пробы (по одной хроматограмме), то в отличие от метода абсолютной градуировки погрешность дозирования здесь не влияет на результат измерения. Влиянием флуктуаций внешних факторов также пренебрегают, так как допущение о постоянстве последних в течение времени записи одной хроматограммы можно признать вполне корректным. Недостаток метода состоит в трудностях, связанных с выбором вещества, пригодного для внутреннего стандарта. В качестве стандарта используют вещество, удовлетворяющее следующим требованиям: 1) стабильность и инертность, полное смешение с пробой; 2) хорошее разделение со всеми компонентами анализируемой смеси; 3) близость химической природы и параметров удерживания внутреннего стандарта и определяемых соединений; 4) отсутствие примесей (в добавляемом в качестве внутреннего стандарта реактиве), накладывающихся на определяемые соединения (наличие примесей, которые хорошо разделяются с анализируемыми компонентами, допустимо, поскольку учитывается при градуировке).

Выбор вещества, удовлетворяющего всем указанным требованиям, на практике оказывается довольно затруднительным. Тем не менее преимущества метода обеспечили ему наиболее широкое использование в практике хроматографического анализа.

Очень важным моментом при работе методом внутреннего стандарта является этап подготовки пробы, который заключается в приготовлении, как правило, гравиметрическим методом смеси, содержащей точно измеренное количество вещества, принимаемого за стандарт. Обычно для приготовления пробы используют небольшие количества веществ; количество стандарта должно соответствовать содержанию примесей в анализируемом продукте. Для этого в склянку (чаще всего используют так называемые пенициллиновые склянки) вносят около 5 мл анализируемого вещества и добавляют 20—50 мкл вещества-стандарта (после каждой операции выполняют взвешивание на аналитических весах). В этом случае концентрация стандарта составляет около 1%. Для получения смеси, содержащей стандарт на уровне сотых и тысячных долей процента, используют метод двойного разбавления, который заключается в том, что около 40—50 мкл первой смеси вносят во вторую склянку, содержащую 3—10 мл анализируемого продукта. Небольшие количества добавок вводят с помощью микрошприца вместимостью 50—100 мкл или микропипетки вместимостью 0,1 мл.

Погрешность массы вещества-стандарта в этом случае может составлять 1—2%. Эта погрешность является одной из систематических составляющих суммарной погрешности хроматографического анализа.

Когда готовят смеси для градуировки, определяемые вещества разбавляют до уровня определяемых концентраций растворителем, не содержащим эти вещества. При вводе примесных компонентов

в склянку с растворителем иглу шприца не следует погружать в раствор; кончиком иглы нужно осторожно прикоснуться к стенке склянки как можно ближе к поверхности раствора, чтобы снять каплю добавляемого вещества. Если проводят добавки нескольких компонентов, склянку нельзя встряхивать во избежание попадания раствора на пробку вплоть до последнего взвешивания. В тех случаях, когда используют резиновые пробки, добавки лучше делать с помощью шприца, иглой которого прокалывают пробку. Если используют склянки с пробками, которые открывают для введения добавок, следует предварительно провести холостой опыт для проверки отсутствия потерь массы за счет испарения раствора из склянки. Для этого открывают склянку на время, необходимое для введения добавки, вновь закрывают и повторно взвешивают. Вес не должен уменьшиться на величину, превышающую погрешность взвешивания (обычно 0,0002 г).

При анализе таких летучих веществ, как ацетон, метанол, метиленхлорид, возникают особенно большие трудности при приготовлении градуировочных смесей. Обжимка резиновой пробки на пенициллиновой склянке металлическим колпачком не обеспечивает герметичности. Поэтому в работе используют либо полиэтиленовые пробки, либо склянки со шлифом. При введении добавок, если склянку открывают даже на минимальное время, содержимое улетучивается. Так, при работе с метиленхлоридом потери составили 5—10% от массы добавляемого компонента (абсолютные потери при однократном открывании пробки — до 0,0035 г). В таких случаях следует многократно повторить холостой опыт, определить средний размер потерь и учитывать эту величину в последующих расчетах.

Характер вещества-стандарта и его расположение на хроматограмме оказывает заметное влияние на погрешность результатов определения количественного состава анализируемой смеси. В табл. V.1 представлены данные по статистической обработке результатов газохроматографического определения методом внутреннего стандарта массовой доли ацетона в модельных смесях, содержащих вещества различной химической природы в концентрациях около 1%. При этом за стандарт принимали поочередно все другие компоненты смеси. Из таблицы видно, что наименьшая ошибка достигается в том случае, когда за стандарт принимают вещество, площадь хроматографического пика которого определяется с наименьшей погрешностью. При нарушении требований, предъявляемых к выбору вещества-стандарта, в частности при неполном разделении его с одним из компонентов смеси, погрешности могут значительно возрастать.

В табл. V.2 приведены значения  $s_r$  для различных компонентов смеси.

В методе внутреннего стандарта градуировка состоит в определении градуировочных коэффициентов  $K_i$ ; погрешность градуиров-

*Таблица V.1. Массовая доля ацетона (X) в многокомпонентной смеси, найденная с разными внутренними стандартами (введено ацетона 0,895%)*

Внутренний стандарт	X, %	Среднее квадратическое отклонение $s$ , %	Относительное $s \cdot 10^2$ , %
Гептан	0,864	0,039	4,6
Дибутиловый эфир	0,911	0,050	5,6
трет-Бутанол	0,925	0,022	2,4
Метанол	0,834	0,056	6,7
Изобутилацетат	0,862	0,025	2,8
Бутилацетат	0,872	0,031	3,6
n-Пропанол	0,918	0,035	3,8

*Таблица V.2. Значения относительного среднеквадратичного отклонения ( $s_r \cdot 10^2$ ) при определении содержания примесных компонентов с различными внутренними стандартами*

Компонент	Внутренний стандарт							
	Гептан	Ацетон	Дибутиловый эфир	трет-Бутанол	Метанол	Изобутилацетат	Бутилацетат	n-Пропанол
Гептан	—	3,9	2,9	5,4	6,6	3,0	4,1	4,5
Ацетон	3,8	—	4,7	2,2	6,3	2,6	3,3	3,2
Дибутиловый эфир	5,2	2,9	—	4,9	6,8	2,8	4,6	5,4
трет-Бутанол	5,3	3,0	4,6	—	4,3	2,7	5,1	2,6
Метанол	8,5	6,0	7,0	4,2	—	4,7	6,8	4,1
Изобутилацетат	2,9	2,3	2,0	2,4	4,1	—	3,4	4,0
Бутилацетат	4,2	3,4	3,7	6,5	5,7	3,5	—	4,1
n-Пропанол	4,6	3,3	4,6	2,7	2,1	4,3	4,2	—

ки в этом случае характеризуют суммарной погрешностью установления  $K_i - \Delta_K$ . Методика приготовления градуировочной смеси и ее аттестация по процедуре приготовления изложены в Приложении, а способ оценки  $\Delta_K$  — в конце настоящего раздела.

При анализе многокомпонентных смесей часто возникает ситуация, когда провести градуировку по всем примесным компонентам не представляется возможным, так как часть идентифицированных компонентов либо недоступна, либо не выпускается по нормативно-технической документации. Поэтому особую актуальность приобретает возможность априорной оценки градуировочных коэффициентов. Такая оценка возможна на основании установленного в результате детальных исследований механизма детектирования корреляционных уравнений, связывающих структуру анализируемых веществ с выходным сигналом детектирующей системы. Остановимся более подробно на некоторых результатах подобных исследований, уделив основное внимание наиболее

используемому в практике газохроматографического анализа пламенно-ионизационному детектору (ПИД).

Многочисленные экспериментальные наблюдения позволили выявить две характерные особенности ПИД: 1) отклик детектора для углеводородов пропорционален числу атомов углерода в молекуле; 2) для замещенных углеводородов отклик меньше, чем для исходного вещества. Эти особенности легли в основу концепции «эффективного углеродного числа» ( $N_C^э$ ), где отклик ПИД для функциональной группы количественно выражается через сигнал, отнесенный к одному атому углеводорода.

Существует общий подход к оценке вклада различных функциональных групп в  $N_C^э$  соединения, суть которого отражена в табл. V.3. Рассчитанные значения являются суммой вкладов различных атомов, входящих в молекулу, с поправкой на присутствие функциональных групп. Например, для гексанона, содержащего 6 алифатических атомов углерода (+6,0) и один первичный спиртовой кислород (−0,5),  $N_C^э=5,5$ . Единичный галоген, приходящийся на атом углерода, дает незначительный эффект, но когда число атомов галогена  $>1$ , вклад каждого атома равен −0,12 единиц. Таким образом, отклик для  $CCl_4$  составляет 0,5 отклика для  $CH_4$ .

Таблица V.3. Вклады в эффективное углеродное число

Атом	Тип соединения	Вклад в $N_C^э$	Атом	Тип соединения	Вклад в $N_C^э$
Углеводороды:			Спирты:		
C	алифатические	1,0	O	первичные	−0,5
C	ароматические	1,0	O	вторичные	−0,75
C	олефиновые	0,95	O	третичные	−0,25
C	ацетиленовые	1,30	Амины:		
C	Карбонильная группа	0	N	первичные	−0,5
C	Карбоксильная группа	0	N	вторичные	−0,75
C	Нитрилы	0,3	N	третичные	−0,25
O	Эфиры	−1,0			

В табл. V.4 представлены результаты сопоставления [105] экспериментально найденных значений градуировочных коэффициентов  $K$  и вычисленных на их основе значений  $N_C^э$  с теоретическими значениями  $(N_C^э)_{теор}$  и вычисленными на их основе  $N_{расч}^э$ . Последнюю величину рассчитывали, исходя из молекулярной массы и  $N_C^э$  исследуемого соединения и стандарта. В качестве стандарта использовали  $n$ -тетрадекан, для которого  $N_C^э=14$ . Вместо  $H-C_{14}$  может быть взято любое вещество, если для него известно  $N_C^э$  относительно углеводорода. Расчеты  $N_C^э$  проводили на основе относительных весовых или мольных откликов, соответствующих градуировочным коэффициентам

$$K = S_{ст}m_i / S_i m_{ст} \text{ или } K_{мол} = K M_{ст} / M_i; (N_C^э)_i = (N_C^э)_{ст} / K_{мол};$$

Таблица V.4. Экспериментальные и расчетные значения  $K$  и  $N_C^3$ 

Компонент	$K$	$N_C^3$	$K_{расч}$	$(N_C^3)_{теор}$
Ацетилен	0,93	1,95	0,91	2,0
Этилен	0,98	2,00	0,98	2,0
Метанол	4,35	0,52	4,55	0,5
Гексан	1,01	5,82	0,98	6,0
Этанол	2,17	1,48	2,13	1,5
<i>n</i> -Пропанол	1,67	2,52	1,69	2,5
Изопропанол	1,89	2,24	1,69	2,5
<i>n</i> -Бутанол	1,52	3,42	1,47	3,5
Амиловый спирт	1,41	4,37	1,37	4,5
Масляный альдегид	1,61	3,12	1,67	3,0
Энантовый альдегид	1,30	6,14	1,33	6,0
Каприловый альдегид	1,28	6,99	1,28	7,0
Каприновый альдегид	1,25	8,73	1,22	9,0
Уксусная кислота	4,17	1,01	4,17	1,0
Пропионовая кислота	2,50	2,07	2,56	2,0
Масляная кислота	2,08	2,95	2,04	3,0
Капроновая кислота	1,59	5,11	1,61	5,0
Энантовая кислота	1,64	5,55	1,52	6,0
Каприновая кислота	1,54	6,55	1,45	7,0
Ацетон	2,04	2,00	2,04	2,0
Метилэтилкетон	1,64	3,07	1,67	3,0
Метилизобутилкетон	1,41	4,97	1,39	5,0
Этилбутилкетон	1,41	5,66	1,33	6,0
Диизобутилкетон	1,39	7,15	1,23	8,0
Этиламилкетон	1,25	7,16	1,28	7,0
Циклогексанон	1,39	4,94	1,37	5,0

$$(N_C^3)_i = M_i (N_C^3)_{ст} / M_{ст} K,$$

где  $S_i$  и  $S_{ст}$ ,  $m_i$ ,  $m_{ст}$ ,  $M$  и  $M_{ст}$  — площади пиков, массы и молекулярные массы анализируемого соединения и стандарта соответственно.

Тогда  $K = M_i (N_C^3)_{ст} / M_{ст} (N_C^3)_i$ .

Можно заключить, что при работе с ПИД расчет  $N_C^3$  является несложным средством оценки градуировочного коэффициента без

Таблица V.6. Массовые доли (%) компонентов, вычисленные с разными внутренними стандартами и с градуировочными коэффициентами, определенными различными способами

Внутренний стандарт	Компонент	«Введено» $X_i$ , %	$K_{эксп}$	
			$\bar{X}$ , %	$\delta$ , %
<i>n</i> -Гептан	Ацетон	0,895	0,903	0,9
	Метанол	0,906	0,897	1,0
	<i>n</i> -Пропанол	0,919	0,927	0,9
Изобутилацетат	Ацетон	0,895	0,928	3,7
	Метанол	0,906	0,927	2,3
	<i>n</i> -Пропанол	0,919	0,922	0,2

Таблица V.5. Градуировочные коэффициенты относительно *n*-гептана, определенные различными методами

Компонент	Экспериментальный	Графический (по $m_C$ )	Расчетный (по $N_C$ )
<i>n</i> -Гептан	1,00	1,00	1,00
Ацетон	1,89	1,57	2,04
Дибутиловый эфир	1,33	1,22	1,30
трет-Бутанол	1,32	1,52	1,52
Метанол	1,82	2,23	4,48
Изобутилацетат	1,59	1,58	1,90
Бутилацетат	1,61	1,58	1,80
<i>n</i> -Пропанол	1,64	1,60	1,68

его экспериментального определения. Этот прием может быть использован не только для соединений, анализируемых в исходной форме, но и для компонентов, которые были подвергнуты химическому превращению, причем расчет  $N_C$  может быть скорректирован со структурой производной формы.

Известны более простые способы априорной оценки градуировочных коэффициентов, учитывающие, например, в классической формуле Онгкиехонга соотношение между молекулярной массой анализируемого соединения  $M_i$  и числом атомов углерода в его молекуле  $n_C$ :

$$f = M_i / 12n_C,$$

либо в графическом способе [106] процентное содержание углерода в молекуле  $m_C$ . Последний способ — расчетно-экспериментальный: определяют  $K_i$  для произвольного ряда веществ с различным  $m_C$ , строят график зависимости  $K_i$  от  $m_C$  и по этому графику для других веществ по известному  $m_C$  находят  $K_i$ . Для алифатических соединений отношение  $K/f=1$ , для соединений, содержащих гетероатом (O или N), это отношение составляет 1,21—1,25.

В табл. V.5 представлены результаты сравнения трех способов

$K_{\text{граф}} \text{ (по } m_C)$		$K_{\text{расч}} \text{ (по } N_C^3)$		Без коэффициента ( $K=1$ )	
$\bar{X}, \%$	$\delta, \%$	$\bar{X}, \%$	$\delta, \%$	$\bar{X}, \%$	$\delta, \%$
0,750	16,2	0,975	8,9	0,473	47,2
1,100	21,4	2,208	143,7	0,498	45,0
0,904	1,6	0,949	3,3	0,560	39,1
0,772	13,7	0,881	1,6	0,752	16,0
1,146	26,5	2,024	123,4	0,795	12,3
0,904	1,6	0,832	9,4	0,892	2,9



определения градуировочных коэффициентов: экспериментально, графического по  $m_c$  и расчетного по  $N_c^*$  для компонентов модельной смеси, содержащей *n*-гептан, ацетон, дибутиловый эфир, *трет*-бутанол, метанол, изобутилацетат, бутилацетат, *n*-пропанол. Каждый компонент был введен на уровне 1% в хроматографически чистый изобутанол. Данные табл. V.5 по  $K$  и экспериментальные данные по площадям пиков использованы для вычисления концентраций компонентов модельной смеси методом внутреннего стандарта.

Среднеизмеренные величины массовых долей примесных компонентов  $\bar{X}$  сравнивали с их истинными значениями  $X_{и}$ ; точность измерений характеризовали относительной погрешностью  $\delta = [(|X_{и} - \bar{X}|) / X_{и}] \cdot 100\%$ . Как видно из представленных в табл. V.6 результатов, использование расчетных значений градуировочных коэффициентов (хотя и снижает точность по сравнению с  $K_{эксп}$ ) в большинстве случаев значительно повышает ее по сравнению с расчетом при  $K=1$ . Резко контрастны данные по метанолу, что подтверждает известные факты о плохом подчинении первых членов гомологических рядов закономерностям, выявленным для всего ряда в целом.

Результаты измерения площадей пиков на хроматограммах 9-компонентной модельной смеси использованы в качестве исходных данных для машинного эксперимента по исследованию влияния числа неидентифицированных примесей, т. е. примесей, содержание которых рассчитывали без учета градуировочного коэффициента ( $K_i = 1$ ), на отклонение ( $\delta$ ) найденного суммарного содержания примесных компонентов ( $\sum X_i$ ) от истинного  $\sum X_{и}^*$ :

$$\delta' = [(|\sum X_i^* - \sum X_i|) / \sum X_i^*] \cdot 100\%.$$

Разработанная программа позволяла просчитывать различные комбинации, а именно: менялось общее число неидентифицированных примесей ( $n$ ), а также варьировался состав неидентифицированных примесей, входящих в это число. При фиксированном  $n$  и переборе 7 примесных компонентов (по восьмому компоненту был определен  $K_{эксп}$ , а девятый компонент — изобутанол как основной компонент в расчетах не учитывался) погрешность существенно менялась (от 5 до 12%), что и отразилось в зависимости  $\delta$  от  $n$  в виде «рыбок» (рис. V.4).

Расчеты выполнены для двух вариантов: за внутренний стандарт принимали *n*-гептан и изобутилацетат. Во втором случае, когда за внутренний стандарт принимают вещество, которое ближе по своей химической природе к определяемым примесям, максимальное отклонение достигает 15%, в то время как в первом случае — 40%. Это дает основание говорить о возможности использования для определения градуировочных коэффициентов веществ, максимально близких по природе (т. е. аналогов, изомеров основ-

ного вещества) для приготовления аттестованных смесей при отсутствии веществ действительно являющихся компонентами анализируемого образца.

Необходимость использования аналогов диктуется тем, что при градуировке наряду с установлением абсолютного значения  $K$  должна быть установлена и суммарная погрешность  $\Delta_K$ . Иначе при оценке характеристик погрешности методики выполнения измерений сложится парадоксальная ситуация, когда погрешность определения компонентов, для которых принято заведомо неточное допущение о  $K_i = 1$  ( $\Delta_K$  не задается и фактически принимается, что  $\Delta_K = 0$ ) окажется ниже, чем компонентов, для которых экспериментально найдены величины  $K$  и  $\Delta_K$ . Поэтому с учетом собственного опыта, литературных данных наряду с допущением о  $K_i = 1$ , необходимо принимать второе допущение о не равном нулю значении  $\Delta_K$ .

Перейдем к рассмотрению процедуры по установлению характеристик погрешности методик выполнения хроматографических измерений методом внутреннего стандарта. В подотрасли химических реактивов Минхимпрома разработан документ (МУ 6—09—70—87 «Требования к построению, содержанию и изложению методик выполнения газохроматографических измерений содержаний компонентов проб химических органических продуктов»), регламентирующий порядок этой процедуры. В нем изложена последовательность применения известных статистических закономерностей к определению случайной погрешности данного аналитического метода, а также выделены отдельные составляющие неисключенной систематической погрешности.

Неисключенная систематическая составляющая суммарной погрешности результата анализа складывается из трех суммируемых погрешностей: погрешности взвешивания при определении массы добавляемого к анализируемой пробе внутреннего стандарта, погрешности, учитывающей содержание основного вещества по нормативно-технической документации (НТД) во внутреннем стандарте, и погрешности измерения градуировочного коэффициента.

План эксперимента с учетом выбранной математической модели включает три основных этапа: 1) приготовление аттестованной смеси; 2) градуировка прибора и определение характеристик погрешности градуировочных коэффициентов; 3) анализ образцов и определение характеристик погрешности результата анализа.

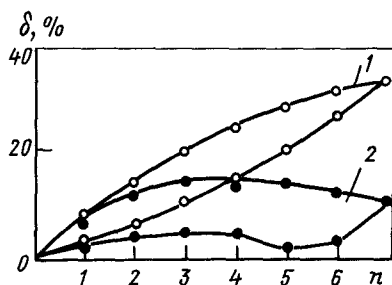


Рис. V.4. Относительное отклонение ( $\delta$ ) расчетного суммарного содержания примесных компонентов от истинного для внутренних стандартов в зависимости от числа неидентифицированных примесей  $n$ :

1 — гептана, 2 — изобутилацетата

Градуировочные коэффициенты  $K$  определяют по смеси, аттестованной по процедуре приготовления. Аттестованная смесь содержит растворитель, компоненты анализируемой пробы и вещество, принимаемое за внутренний стандарт, в концентрациях, приближенно соответствующих их содержанию в анализируемой пробе. Необходимым условием является наличие НТД на каждый компонент смеси. Если идентифицированные компоненты труднодоступны или на них отсутствует НТД, то допускается подготовка смеси на основе их аналогов или изомеров.

Для определения случайной составляющей погрешности значения  $K$  в условиях методики выполнения измерений снимают  $n$  ( $n \geq 5$ ) хроматограмм аттестованной смеси с содержанием анализируемого компонента в граммах  $m_i$  и внутреннего стандарта  $m_{\text{ст}}$  и измеряют соответствующие площади пиков  $S_i$  и  $S_{\text{ст}}$ . Из каждой хроматограммы для каждого компонента рассчитывают значение  $K$  по формуле:

$$K = S_{\text{ст}} m_i / S_i m_{\text{ст}}$$

Вычисляют среднее измеренное значение этой величины  $\bar{K}$ :

$$\bar{K} = \sum_{n=1}^N K_n / n.$$

Рассчитывают среднее квадратическое отклонение  $s_K$  единичного измерения  $K$  по формуле:

$$s_K = \sqrt{\sum_{n=1}^N (\bar{K} - K_n)^2 / (n-1)}.$$

После этого проводят проверку наиболее отклоняющихся результатов наблюдений по  $\beta$ -критерию. Для этого выбирают в ряду параллельных определений наибольшее или наименьшее значение и вычисляют

$$u_{\text{нмакс}} = (K_{\text{нмакс}} - \bar{K}) / s_{\bar{K}} \text{ или } u_{\text{нмин}} = (\bar{K} - K_{\text{нмин}}) / s_{\bar{K}}.$$

Из табл. 1 Приложения I для числа параллельных определений  $n$  находят значение коэффициента  $\beta$ . В ряду параллельных определений не содержится грубых промахов, если выполняется условие

$$u_{\text{нмакс}} \leq \beta \text{ или } u_{\text{нмин}} \leq \beta.$$

Если  $u_{\text{нмакс}}$  или  $u_{\text{нмин}} > \beta$ , то соответствующие значения  $K_n$  следует исключить из дальнейших расчетов. В таком случае после исключения грубых промахов повторяют расчет  $\bar{K}$  и  $s_{\bar{K}}$ .

Так как при расчете содержания мольных долей используют среднее измеренное значение  $\bar{K}$ , то случайную составляющую погрешности определения  $\bar{K}$  рассчитывают для средней измеренной величины по формуле:

$$s_{\bar{K}} = \sqrt{\sum_{n=1}^N (\bar{K} - K_n)^2 / n(n-1)}.$$

Неисключенную систематическую составляющую погрешности  $\Theta$  вычисляют путем построения композиции неисключенных систематических погрешностей средств измерений, метода и погрешностей, вызванных другими источниками, по формуле:

$$\Theta = k \sqrt{\sum_{i=1}^m \Theta_i^2},$$

где  $k$  — коэффициент, принимаемый равным 1,1, при доверительной вероятности 0,95;  $\Theta_i$  —  $i$ -я неисключенная систематическая погрешность.

В нашем случае в качестве неисключенных систематических погрешностей следует принять погрешности взвешивания и погрешности, учитывающие содержание по НТД основного вещества ( $N$ ) в используемых для приготовления аттестованных смесей реактивах ( $\delta_m^{\text{TV}}$ ). Для этого принимают [108], что погрешность содержания основного вещества составляет половину интервала от величины, заложенной в НТД, до 100%, т. е.  $(100 - N)/2$ . Тогда по отношению к навеске  $m$  погрешность  $\delta_m^{\text{TV}}$  можно записать:

$$\delta_m^{\text{TV}} = m (100 - N)/(2 \cdot 100).$$

Суммарную относительную систематическую погрешность градуировочного коэффициента рассчитывают по формуле:

$$\frac{\Theta_K}{\bar{K}} = 1,1 \sqrt{\left(\frac{\delta_m}{m_i}\right)^2 + \left(\frac{\delta_m}{m_{\text{ст}}}\right)^2 + \left(\frac{\delta_m^{\text{TV}}}{m_i}\right)^2 + \left(\frac{\delta_m^{\text{TV}}}{m_{\text{ст}}}\right)^2}.$$

Так как массы  $m_i$  и  $m_{\text{ст}}$  определяют по разности двух взвешиваний, то  $\delta_m$  представляет собой суммарную погрешность двух взвешиваний на весах, точность которых принимают равной 0,0002 г, т. е.

$$\delta_m = \sqrt{(0,0002)^2 + (0,0002)^2} = 0,0003.$$

Таким образом,  $\Theta_{\bar{K}}$  вычисляют по формуле:

$$\Theta_K = 1,1 \cdot \bar{K} \sqrt{\left(\frac{0,0003}{m_i}\right)^2 + \left(\frac{0,0003}{m_{\text{ст}}}\right)^2 + \left(\frac{100 - N_i}{200}\right)^2 + \left(\frac{100 - N_{\text{ст}}}{200}\right)^2}.$$

Далее проводят сопоставление неисключенной систематической погрешности  $\Theta_K$  со случайной погрешностью  $s_{\bar{K}}$ . Для этого рассматривают отношение  $\Theta_K/s_{\bar{K}}$ . Если эта величина меньше 0,8, то неисключенными систематическими погрешностями по сравнению со случайными пренебрегают и принимают, что граница погрешности результата измерения  $\Delta = \epsilon$ , где  $\epsilon$  — доверительные границы случайной погрешности:

$$\epsilon = t s_{\bar{K}},$$

где  $t$  — коэффициент Стьюдента для доверительной вероятности 0,95 и числа измерений  $n$ , который находят из табл. 3 Приложения I.

Если отношение больше 8, то пренебрегают случайной погрешностью по сравнению с систематической и принимают, что граница погрешности результата  $\Delta = \Theta$ .

В случае, если  $0,8 < (\Theta/s) < 8$ , погрешность результата измерения находят путем построения композиции распределений случайных и неисключенных систематических погрешностей и вычисляют по формуле:

$$\Delta_K = k s_{\Sigma},$$

где  $k$  — коэффициент, зависящий от соотношения случайной и неисключенной систематической погрешностей;  $s_{\Sigma}$  — оценка суммарного среднего квадратического отклонения результата измерений.

Оценку суммарного среднего квадратического отклонения результата измерения вычисляют по формуле:

$$s_{\Sigma} = \sqrt{\left(\sum_{i=1}^m \Theta_i^2/3\right) + s_K^2},$$

где  $m$  — число суммируемых погрешностей

Коэффициент  $k$  вычисляют по эмпирической формуле

$$k = \varepsilon + \Theta_K/(s_K + \sqrt{\sum_{i=1}^m \Theta_i^2/3}).$$

Результат измерения представляют в виде  $k \pm \Delta_K$ .

Далее определяют суммарную погрешность измерения массовой доли  $i$ -го компонента.

Для определения случайной составляющей погрешности измерения массовой доли примесей в условиях методики выполнения измерений снимают  $n$  ( $n \geq 5$ ) хроматограмм анализируемого продукта (масса  $m_a$ ) с добавкой внутреннего стандарта (масса  $m_{ст}$ ). Из каждой хроматограммы рассчитывают массовую долю  $i$ -го компонента по формуле (приведенные далее расчеты должны быть проведены для каждой  $i$ -й примеси):

$$X_i = S_i K_i m_{ст} \cdot 100 / (S_{ст} m_a),$$

где  $S_i$  и  $S_{ст}$  — площади пиков  $i$ -го компонента и вещества-стандарта соответственно

Рассчитывают среднее измеренное значение величины  $\bar{X}_i$  и среднее квадратическое отклонение  $s_X$  единичного измерения  $X_i$ :

$$s_X = \sqrt{\sum_{n=1}^N (\bar{X}_i - X_{in})^2 / (N - 1)}.$$

Проводят проверку наиболее отклоняющихся наблюдений, как изложено выше.

Для нормируемых примесей вычисляют допускаемое расхождение

ние между двумя параллельными определениями по формуле:

$$d = k s_X,$$

где  $k$  — коэффициент, определяемый по табл. 2 Приложения 1.

Случайная составляющая погрешности измерения массовой доли  $i$ -го компонента представляет среднее квадратическое отклонение измерения, являющегося средним из двух определений, так как за результат анализа принимают среднее значение двух параллельных определений, т. е.

$$s_{\bar{X}} = s_X / \sqrt{2}.$$

Неисключенную систематическую составляющую суммарной погрешности измерения массовой доли  $i$ -го компонента в соответствии с вышеизложенным определяют по формуле:

$$\Theta_{X_i} = 1,1 X_i \sqrt{\left(\frac{0,0003}{m_{\text{ст}}}\right)^2 + \left(\frac{0,0003}{m_a}\right)^2 + \left(\frac{100 - N_{\text{ст}}}{200}\right)^2 + \left(\frac{\Delta_{k_i}}{\bar{K}_i}\right)^2}.$$

Далее проводят сопоставление неисключенной систематической и случайной составляющих суммарной погрешности и тем или иным способом определяют характеристику погрешности результата анализа  $\Delta_X$ . Результат записывают в виде  $X \pm \Delta_X$  при доверительной вероятности 0,95 и допускаемом расхождении между двумя параллельными определениями, равном  $d$ .

Суммарное содержание примесных компонентов определяют как сумму массовых долей отдельных компонентов. Погрешности определения каждого компонента также суммируют по формуле

$$\Delta_{\Sigma X} = \sqrt{\sum_{i=1}^n \Delta_{X_i}^2}.$$

Допускаемое расхождение между двумя параллельными определениями рассчитывают по формуле

$$d = k \sqrt{\sum_{i=1}^n s_{X_i}^2}.$$

Установленные характеристики погрешности результата анализа записывают следующим образом: за результат анализа принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, расхождение между которыми не превышает значения допускаемого расхождения, равного  $d$ . Пределы допускаемого значения суммарной погрешности результата анализа составляют  $\pm \Delta_X$  при доверительной вероятности  $P=0,95$ .

В заключение раздела о методе внутреннего стандарта остановимся кратко на двух его разновидностях — методах добавок и двойного внутреннего стандарта.

В тех случаях, когда выбор внутреннего стандарта затруднен, используют метод добавки. Фактически это вариант метода внутреннего стандарта, при котором в качестве последнего используют

один из примесных компонентов анализируемой пробы. Снимают в одинаковых условиях хроматограммы исходной пробы (массой  $m_a$ ) и пробы с добавкой (масса добавки  $m_d$ ). В расчетной формуле (V.6) для  $X_i$  вместо площади пика внутреннего стандарта (или эквивалентного ей параметра  $h$  или  $h\tau$ ) используют разность между площадями пиков выбранного в качестве добавки компонента на хроматограммах с добавкой ( $S_d$ ) и без нее ( $S_d^{исх}$ ). Поскольку используют абсолютные величины площадей и берут их из разных хроматограмм, с целью исключения влияния погрешности дозирования вводят поправочный множитель, равный отношению  $S_2^k/S_1^k$ , где  $S_2^k$  и  $S_1^k$  — площади пиков  $k$ -го компонента на хроматограммах с добавкой и без добавки соответственно.

Если объем пробы с добавкой и без добавки одинаков, то  $(S_2^k/S_1^k) = 1$ .

В качестве  $k$ -го выбирают один из компонентов анализируемой пробы, погрешность определения площади пика для которых минимальна.

Массовую долю каждого из примесных компонентов ( $X_i$ , %) вычисляют по формуле:

$$X_i = \frac{S_i K_i m_d \cdot 100}{[S_d - S_d^{исх} (S_2^k/S_1^k)] m_a}$$

Интерполяционный метод двойного внутреннего стандарта обеспечивает улучшение воспроизводимости результатов и предусматривает введение в пробу индивидуальных веществ, которые должны элюировать до и после определяемых компонентов [107]. В зависимости от локализации пика  $i$ -го компонента на хроматограмме влияние образцов сравнения будет неодинаковым.

Метод теряет свои преимущества и фактически переходит в обычный метод с одним внутренним стандартом, если один из образцов сравнения элюирует слишком далеко от анализируемого компонента, так как в этом случае определяющим будет влияние лишь одного, наиболее близко расположенного образца сравнения.

Расчет массовой доли определяемых компонентов проводят по формуле:

$$X_i = 100 (S_i K_i / m_a) \sqrt{(m_{ст1} / S_{ст1} K_{ст1}) (m_{ст2} / S_{ст2} K_{ст2})}.$$

Индексы ст 1 и ст 2 относятся к массам  $m$ , площадям пиков  $S$  и градуировочным коэффициентам  $K$  первого и второго внутренних стандартов соответственно.

Наряду с более полной компенсацией влияющих факторов метод двойного внутреннего стандарта обеспечивает снижение систематической погрешности результатов измерений без градуировочных коэффициентов, если образцы сравнения и компоненты пробы имеют близкую молекулярную структуру. Однако случайная

составляющая  $s_x$  суммарной погрешности может и возрастать, так как в методе внутреннего стандарта  $s_x$  определяется погрешностями измерения площадей двух пиков (определяемого компонента и внутреннего стандарта), а в методе двойного внутреннего стандарта — трех (определяемого компонента и двух внутренних стандартов).

Снижения наряду с систематической и случайной погрешности при использовании метода двойного внутреннего стандарта можно ожидать в случае значительного вклада в погрешность коэффициентов влияния нестабильности температуры термостатируемых блоков хроматографической системы и окружающей среды, изменений барометрического давления, вариаций расхода газа-носителя и вспомогательных газов. Использование одного внутреннего стандарта в случаях не слишком продолжительного времени анализа оказывается достаточным для компенсации влияющих факторов. В случаях анализа сложных смесей с широким диапазоном времен удерживания компонентов одного стандарта может оказаться недостаточно для компенсации указанных эффектов и интерполяционный метод двойного внутреннего стандарта дает возможность снизить случайную составляющую погрешности.

Проиллюстрируем возможности метода двойного внутреннего стандарта примером анализа искусственной смеси, близкой по качественному составу к изобутиловому спирту реактивной квалификации. Смесь готовили весовым методом с погрешностью взвешивания 0,0002 г на основе изобутанола с добавлением в качестве примесей (по мере роста времен удерживания) *n*-гептана, ацетона, дибутилового эфира, третичного бутанола, метанола, изобутилацетата, бутилацетата и *n*-пропанола. Все использованные реактивы соответствовали квалификации «хч для хроматографии». Содержание каждого примесного компонента составляло около 1%. Анализ проводили на газовом хроматографе «Цвет-100» с пламенно-ионизационным детектором. Использовали колонку длиной 3 м, заполненную динохромом П с 10% полиэтиленгликоля с молекулярной массой 300; температура колонок 85 °С, расход газа-носителя (азота) 40 мл/мин. Градуировочные коэффициенты определяли по *n*-гептану. Обработку хроматограмм осуществляли вручную. При расчетах концентраций по методу двойного внутреннего стандарта в качестве внутренних стандартов использовали компоненты анализируемой смеси, выходящие непосредственно до и после определяемого компонента. Так, при определении ацетона внутренний стандарт 1 — *n*-гептан и внутренний стандарт 2 — дибутиловый эфир; при определении дибутилового эфира — ацетон и третичный бутанол соответственно и т. д. При определении бутилацетата — изобутилацетат и *n*-пропанол ( $K_i = 1,64$ ).

Полученные результаты представлены в табл. V.7 и V.8, в которых  $\bar{X}$  — средняя арифметическая величина концентрации (в %) из 10 определений;  $s_x$  — среднее квадратическое отклонение еди-



*Таблица V.7 Сравнение двух методов количественного анализа с учетом градуировочных коэффициентов ( $n=10$ ,  $P=0,95$ )*

Компонент	$K_i$	«Введено» $X_{in}$ , %	Метод внутреннего стандарта				Метод двойного внутреннего стандарта			
			«Найдено» $\bar{X}$ , %	$s_{\bar{X}}$ , %	$I$ , %	$\delta$ , %	«Найдено» $X$ , %	$s_X$ , %	$I$ , %	$\delta$ , %
Ацетон	1,89	0,893	0,863	0,039	4,52	3,36	0,900	0,084	9,35	0,79
Дибутиловый эфир	1,33	0,865	0,843	0,043	5,06	2,54	0,849	0,112	13,2	1,90
Третичный бутанол	1,32	0,894	0,840	0,053	6,32	6,04	0,879	0,078	8,89	1,68
Метанол	1,82	0,916	0,919	0,094	10,3	0,33	0,963	0,040	4,19	5,09
Изобутилацетат	1,59	0,995	0,985	0,031	3,15	1,00	0,976	0,020	2,05	1,94
Бутилацетат	1,61	1,003	1,006	0,046	4,55	0,30	1,017	0,048	4,72	1,42

*Таблица V 8. Сравнение двух методов количественного анализа без учета градуировочных коэффициентов ( $n=10$ ,  $P=0,95$ )*

Компонент	«Введено» $X_{in}$ , %	Метод внутреннего стандарта				Метод двойного внутреннего стандарта			
		«Найдено» $\bar{X}$ , %	$s_{\bar{X}}$ , %	$I$ , %	$\delta$ , %	«Найдено» $\bar{X}$ , %	$s_X$ , %	$I$ , %	$\delta$ , %
Ацетон	0,893	0,478	0,022	4,54	46,5	0,568	0,053	9,35	36,4
Дибутиловый эфир	0,865	0,659	0,027	4,11	23,8	0,978	0,129	13,2	13,1
Третичный бутанол	0,894	0,674	0,043	6,33	24,6	1,084	0,096	8,89	21,3
Метанол	0,916	0,493	0,051	10,3	46,2	0,737	0,031	4,19	19,6
Изобутилацетат	0,995	0,619	0,019	3,10	37,8	1,071	0,022	2,05	7,64
Бутилацетат	1,003	0,614	0,028	4,57	38,8	0,985	0,047	4,72	1,80

ничного измерения  $X$ ;  $I$  — относительное среднее квадратическое отклонение единичного измерения:

$$I = (s_X / \bar{X}) \cdot 100,$$

$\delta$  — относительная точность измерения;

$$\delta = [(|X_n - \bar{X}|) / X_n] \cdot 100$$

Как следует из представленных данных, преимущества метода двойного внутреннего стандарта по сравнению с методом внутреннего стандарта наиболее сильно проявляются в случае расчетов без учета градуировочных коэффициентов. Максимальный эффект в исследуемом случае наблюдали для бутилацетата: снижение  $\delta$  с 38,8 до 1,80%.

### 3.3. МЕТОД ВНУТРЕННЕЙ НОРМАЛИЗАЦИИ

Представим себе идеализированный случай: на хроматограмме зафиксированы все компоненты, присутствующие в анализируемой пробе; сигнал детектора линеен во всем диапазоне концентраций, чувствительность детектора одинакова по отношению ко всем компонентам пробы. Тогда, если принять сумму площадей всех  $N$  пи-

ков  $\left(\sum_{i=1}^N S_i\right)$  за 100%, то доля каждого индивидуального компонента в смеси ( $X_k$ ) будет пропорциональна площади его пика  $S_k$ ,

отнесенной к  $\sum_{i=1}^N S_i$ , т. е.

$$X_K = (S_K / \sum_{i=1}^N S_i) \cdot 100. \quad (V 7)$$

Изменение объема вводимой пробы (в пределах, в которых не происходит искажения хроматограммы) или, что важно для метрологических расчетов, погрешность дозирования пробы не влияет на результаты определения, так как для каждого дозирования вновь проводится нормировка — отнесение к 100% площадей всех пиков для введенного объема пробы. Наличие пика растворителя (если он не перекрывает и не искажает пики остальных компонентов) не мешает определению и в расчетах не учитывается. Важно подчеркнуть, что поскольку при расчете содержания каждого индивидуального компонента учитывают площади пиков всех компонентов анализируемой пробы, то неточность в определении площади пика хотя бы одного из них будет искажать результат определения всех компонентов. В этом состоит главный недостаток метода внутренней нормализации. Поэтому каждый раз правомерность использования метода внутренней нормализации должна

быть аргументированно обоснована. В первую очередь нужно подтвердить, что все компоненты анализируемой пробы зарегистрированы на хроматограмме. Для этого образец хроматографируют на нескольких различающихся по природе сорбентах при варьировании рабочих условий, используют независимые методы анализа (хромато-масс-спектрометрию, спектральные, химические), привлекают данные по технологии получения анализируемого образца. Далее в расчетную формулу (V.7) должны быть введены градуировочные коэффициенты, учитывающие как селективную чувствительность детектора по отношению к различным компонентам пробы, так и нелинейность его сигнала.

Так, для пламенно-ионизационного детектора известно [19], что содержание в газе-носителе анализируемых веществ (легких углеводородов) на уровне 5% (об.) соответствует верхнему концентрационному пределу его линейного отклика. Если принять, что в поступающем после колонки в детектор потоке концентрация анализируемых веществ за счет эффектов размывания снижена в 10 раз по сравнению с исходной, то компоненты, содержание которых в дозируемой пробе превышает 50%, регистрируются за пределами линейного диапазона детектора.

С учетом градуировочных коэффициентов  $K_i$  расчетная формула  $X_k$  примет следующий вид:

$$X_k = (S_k K_k / \sum_{i=1}^N K_i S_i) \cdot 100\%. \quad (V.8)$$

Литературные данные по величинам  $K_i$  не учитывают (теоретические никогда, а экспериментальные за редким исключением) эффекта нелинейности детектора. В типичном случае анализируемая смесь содержит основной и примесные компоненты. При анализе такой смеси методом внутреннего стандарта основной пик не регистрируется, и при расчетах массовых долей допустимо использование литературных данных по величинам  $K_i$ . При анализе методом внутренней нормализации в расчетах используют параметры всех пиков, включая и основной, поэтому, по крайней мере, один градуировочный коэффициент  $K_{\text{ок-р}}$  (основной компонент — реперный примесный компонент) должен быть определен экспериментально. Если различие в концентрациях примесных компонентов не приводит к нелинейным эффектам, то допустимо для величин  $K_{i-\text{р}}$  (примесные компоненты — реперный примесный компонент) либо использовать литературные данные, либо в случае близкой природы примесей принять  $K_{i-\text{р}} = 1$ . Отсюда следует нецелесообразность определения  $K_i$  по основному веществу; один из примесных компонентов выбирают в качестве реперного и по нему определяют  $K_i$  для остальных компонентов.

Экспериментальное определение  $K_i$  проводят по градуировочным смесям, близким по количественному составу к анализируе-

мым пробам. Варьирование концентраций достигается, как уже отмечалось, разбавлением смесей растворителем.

Процедура градуировки по примесным компонентам идентична описанной выше для метода внутреннего стандарта. Здесь допустимо использование наряду со стандартными образцами химических реактивов, поскольку при разбавлении растворителем (который не должен содержать исследуемых примесей) концентрации примесей снижаются до уровней, оказывающих незначительное влияние на погрешность установления  $K_i$ . При проведении градуировки по основному веществу наличие примесей в используемых реактивах или стандартных образцах необходимо тем или иным способом учитывать.

Рассмотрим пример проведения градуировки при анализе методом внутренней нормализации 4-компонентной смеси с массовыми долями примесей до 1%. Хромограмма одного из анализируемых образцов представлена на рис. V.5, а. В качестве реперного выбираем примесный компонент (ПК 2), так как погрешность измерения площади более узкого пика ПК 1 выше, а ПК 3 по своим физико-химическим свойствам больше отличается от основного компонента, чем ПК 2 и, как можно предположить, в некоторых образцах будет отсутствовать (колебания в составе сырья, усовершенствование методов очистки) и тогда придется проводить переградуировку прибора.

Цель градуировки — установление градуировочных коэффициентов основного компонента (ОК) по ПК 2 ( $K_{OK-ПК2}$ ), примесных компонентов по ПК 2 ( $K_{ПК1-ПК2}$  и  $K_{ПК3-ПК2}$ ) и их суммарных погрешностей ( $\Delta_k$ ). В наличии имеются все 4 индивидуальных вещества квалификации «химически чистый» и не содержащий их растворитель.

Как следует из хроматограммы основного компонента (рис. V.5, б), в нем присутствуют в качестве примесей ПК 1 и ПК 2. Поэтому определение  $K_{OK-ПК2}$  выполняют методом добавки. Для этого готовят первую градуировочную смесь, содержащую около 99% реактива ОК «хч» (масса  $m_{OK}$ ) и около 1% реактива ПК 2 «хч» (масса  $m_{ПК2}^1$ ); снимают хроматограмму этой смеси (рис. V.5, в) и из двух хроматограмм (б и в) вычисляют  $K_{OK-ПК2}$  по формуле:

$$K_{OK-ПК2} = \frac{m_{OK} [S_{ПК2}^a - S_{ПК2}^b (S_{ПК1}^a / S_{ПК1}^b)]}{m_{ПК2}^1 S_{ОК}^a}$$

где  $S_{ОК}^a$ ,  $S_{ПК1}^a$  и  $S_{ПК2}^a$  — площади пиков ОК, ПК 1 и ПК 2 соответственно на хроматограмме а;  $S_{ПК2}^b$  и  $S_{ПК1}^b$  — площади пиков ПК2 и ПК1 на хроматограмме б

Соотношение площадей пиков ПК1 на хроматограммах в и б вводится в расчетную формулу для корректировки объема пробы

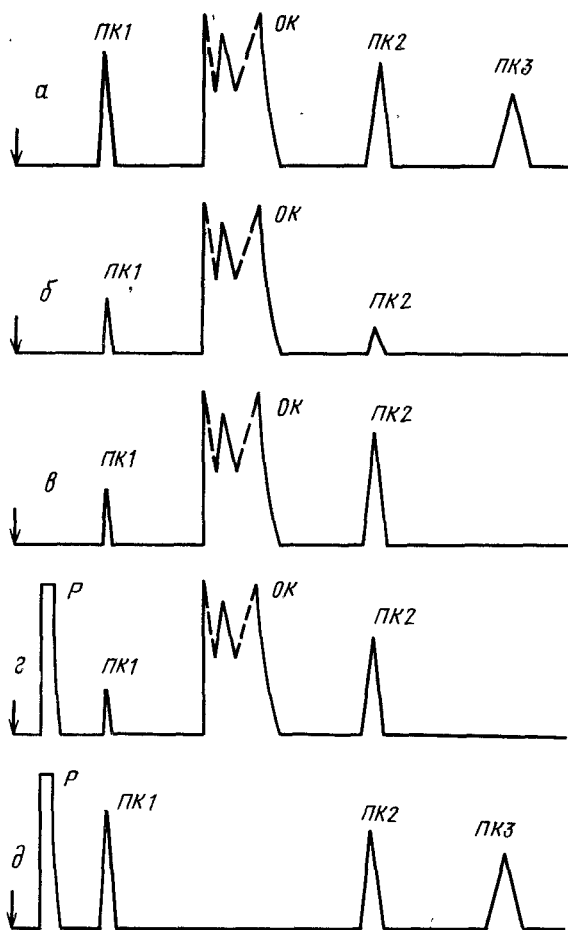


Рис. V.5. Хроматограммы, иллюстрирующие последовательность операций при градуировке в методе внутренней нормализации:

*а* — анализируемый образец, *б* — основной компонент, *в* — градуировочная смесь № 1; *г* — градуировочная смесь № 1 с использованием растворителя, *д* — градуировочная смесь № 2 с использованием растворителя (обозначения пиков на хроматограммах см в тексте)

(содержание ПК1 в реактиве ОК и градуировочной смеси № 1 неизменно).

Для снижения погрешности приготовления градуировочной смеси особенно при низких массовых долях ПК2 ( $< 0,1\%$ ) следует к реактиву ОК добавлять ПК2 в виде раствора в Р (см. хроматограмму на рис. V.5, *г*). Объем пробы подбирают таким образом, чтобы пики ПК1 на хроматограммах *б* и *г* были по площади близки между собой.

Затем готовят вторую градуировочную смесь, содержащую

ПК2 (масса  $m''_{\text{ПК2}}$ ), ПК1 (масса  $m_{\text{ПК1}}$ ) и ПК3 (масса  $m_{\text{ПК3}}$ ) на уровне 1% каждого компонента в растворителе; снимают хроматограмму этой смеси (рис. V.5,д), на основе измеренных площадей  $S_i^{\text{Д}}$  вычисляют градуировочные коэффициенты:

$$K_{\text{ПК1}-\text{ПК2}} = S_{\text{ПК2}}^{\text{Д}} m_{\text{ПК1}} / (S_{\text{ПК1}}^{\text{Д}} m''_{\text{ПК2}}),$$

$$K_{\text{ПК3}-\text{ПК2}} = S_{\text{ПК2}}^{\text{Д}} m_{\text{ПК3}} / S_{\text{ПК3}}^{\text{Д}} m''_{\text{ПК2}}$$

Для определения случайной составляющей погрешности значений градуировочных коэффициентов каждую из указанных хроматограмм снимают по  $n$  раз ( $n \geq 5$ ) и проводят соответствующие вычисления. В качестве слагаемых неисключенной систематической погрешности установления  $K$  ( $\Theta_K$ ) принимают погрешности взвешивания при приготовлении градуировочных смесей и погрешности содержания основного вещества (по нормативно-технической документации) в используемых реактивах. На основании величин  $s_K$  и  $\Theta_K$  по правилам, изложенным в разделе, посвященном методу внутреннего стандарта, определяют величину суммарной погрешности  $\Delta_K$ , которая в дальнейшем используется для вычисления суммарной погрешности определения массовых долей анализируемых компонентов  $\Delta_X$ .

Расчетная формула для  $\Delta_X$ , получаемая после дифференцирования уравнения (V.8) при допущении, что величины  $\Delta_S$  и  $\Delta_K$  являются независимыми и подчиняются закону нормального распределения, и после математических преобразований, имеет вид:

$$\frac{\Delta_{X_K}}{X_K} = \sqrt{(1-X_K)^2 \left[ \left( \frac{\Delta_{K_K}}{K_K} \right)^2 + \left( \frac{\Delta_{S_K}}{S_K} \right)^2 \right] + \sum_{i=1, i \neq k}^N X_i^2 \left[ \left( \frac{\Delta_{K_i}}{K_i} \right)^2 + \left( \frac{\Delta_{S_i}}{S_i} \right)^2 \right]}. \quad (\text{V.9})$$

Прежде чем анализировать формулу (V.9), обратимся к упрощенному уравнению (V.7) и численному примеру. Имеются три смеси с номинальным содержанием суммы примесных компонентов ( $\sum X_i$ ) 1, 0,1 и 0,01%. Площадь пика основного компонента во всех смесях равна ( $S_{\text{ОК}}^{\text{НОМ}}$ ) 6000 мм<sup>2</sup>, а сумма площадей пиков примесей ( $S_{\Sigma X}^{\text{НОМ}}$ ) 60, 6 и 0,6 мм<sup>2</sup> соответственно. Положим, что погрешность определения площадей пиков ( $\Delta_S$ ) для ОК равна 2% и для ПК  $\Delta_S^{\text{ПК}} = 10\%$ . Оценим, насколько будет отклоняться от номинального значения ( $X^{\text{НОМ}}$ ) вычисленная по формуле (V.7) величина  $X$  при варьировании площадей пиков в пределах указанных погрешностей. Максимальные отклонения возможны в двух случаях: когда для  $S_{\text{ОК}} = S_{\text{ОК}}^{\text{НОМ}} + \Delta_S^{\text{ОК}}$  и для ПК  $S_{\Sigma X} = S_{\Sigma X}^{\text{НОМ}} - \Delta_S^{\text{ПК}}$  (вариант 1) либо

когда для ОК  $S_{OK} = S_{OK}^{ном} - \Delta_S^{OK}$  и для ПК  $S_{\Sigma X} = S_{\Sigma X}^{ном} + \Delta_S^{ПК}$  (вариант 2). Все остальные случаи, когда, например,  $\Delta_S$  и для ОК и ПК положительна или отрицательна, либо когда часть ПК имеет  $+\Delta_S^{ПК}$ , а часть —  $-\Delta_S^{ПК}$  (что приведет к снижению  $\Delta_S$  для суммы ПК) — займут по отклонению от  $X^{ном}$  промежуточное положение между вариантами 1 и 2. Отклонения расчетных значений  $X$  от  $X^{ном}$  характеризовали абсолютными  $\Delta_X^{abc} = |X^{ном} - X^{расч}|$  и относительными  $\Delta_X^{отн} = (|X^{ном} - X^{расч}| / X^{ном}) \cdot 100$  величинами. Результаты расчетов представлены в табл. V.9.

Расчеты, проведенные в условиях варьирования абсолютных величин  $S$  для ОК и ПК, а также  $\Delta_S^{OK}$  и  $\Delta_S^{ПК}$  и их соотношений, привели к аналогичным результатам.

Таблица V.9 Погрешность вычисления массовой доли при  $\Delta_S^{OK} = \pm 2\%$

Характеристики погрешности	Смесь № 1						Смесь № 2	
	Номинальное содержание		Вариант 1		Вариант 2		Номинальное содержание	
			$+\Delta_S^{OK}$	$-\Delta_S^{ПК}$	$-\Delta_S^{OK}$	$+\Delta_S^{ПК}$		
	ОК	ПК	ОК	ПК	ОК	ПК	ОК	ПК
$S, \text{мм}^2$	6000	60	6120	54	5880	66	6000	6
$X, \%$	99,01	0,99	99,13	0,87	98,89	1,11	99,90	0,10
$\Delta_X^{abc}, \%$	—	—	0,12	0,12	0,12	0,12	—	—
$\Delta_X^{отн}, \%$	—	—	0,12	12,0	0,12	12,0	—	—

Таблица V.10 Погрешность вычисления массовой доли при номинальном содержании пиков

Характеристики погрешности	Номинальное содержание		$\Delta_S^{OK} = 1\%$		$\Delta_S^{ПК} = 1\%$		$\Delta_S^{OK} = 10\%$	
			Вариант 1		Вариант 2		Вариант 1	
			$+\Delta_S^{OK}$	$-\Delta_S^{ПК}$	$-\Delta_S^{OK}$	$+\Delta_S^{ПК}$	$+\Delta_S^{OK}$	$-\Delta_S^{ПК}$
	ОК	ПК	ОК	ПК	ОК	ПК	ОК	ПК
$S, \text{мм}^2$	6000	60	6060	59,4	5940	60,6	6600	54
$X, \%$	99,01	0,99	99,03	0,97	98,99	1,01	99,19	0,81
$\Delta_X^{abc}, \%$	—	—	0,02	0,02	0,02	0,02	0,18	0,18
$\Delta_X^{отн}, \%$	—	—	0,02	2,0	0,02	2,0	0,18	18,0

В табл. V.10 представлены данные, иллюстрирующие влияние погрешности измерения площадей пиков на  $\Delta_X^{abc}$  и  $\Delta_X^{отн}$  для смеси № 1. Из таблиц следует, что для ПК  $\Delta_X^{отн}$  приближенно-равно сумме ( $\Delta_S^{OK} + \Delta_S^{ПК}$ ). Абсолютные погрешности вычисления по формуле (V.7) массовых долей основного компонента и суммы примесных компонентов совпадают (до знака) между собой. Абсолютная погрешность вычисления  $X^{OK}$  уменьшается по мере увеличения содержания основного компонента. Косвенный расчет  $X^{OK}$  ( $X^{OK} = 100 - \sum X^{ПК}$ ) дает полную сходимость с прямым расчетом, как по  $X^{OK}$ , так и по  $\Delta_X^{OK}$ .

С введением в формулу (V.7) градуировочных коэффициентов ее анализ существенно усложняется. Суммарная погрешность  $\Delta_X$  в  $\Delta_S^{ПК} = \pm 10\%$  в зависимости от содержания компонента в смеси

				Смесь № 3					
Вариант 1		Вариант 2		Номинальное содержание		Вариант 1		Вариант 2	
$+\Delta_S^{OK}$	$-\Delta_S^{ПК}$	$-\Delta_S^{OK}$	$+\Delta_S^{ПК}$			$+\Delta_S^{OK}$	$-\Delta_S^{ПК}$	$-\Delta_S^{OK}$	$+\Delta_S^{ПК}$
OK	ПК	OK	ПК	OK	ПК	OK	ПК	OK	ПК
6120	5,4	5880	6,6	6000	0,6	6120	0,54	5880	0,66
99,912	0,088	99,888	0,112	99,99	0,01	99,9912	0,0088	99,9888	0,0112
0,012	0,012	0,012	0,012	—	—	0,0012	0,0012	0,0012	0,0012
0,012	12,0	0,012	12,0	—	—	0,0012	12,0	0,0012	12,0

жании примесных компонентов в смеси на уровне 1% в зависимости от погрешности

$\Delta_S^{ПК} = 10\%$		$\Delta_S^{OK} = 9\%$		$\Delta_S^{ПК} = 1\%$		$\Delta_S^{OK} = 1\%$		$\Delta_S^{ПК} = 9\%$	
Вариант 2		Вариант 1		Вариант 2		Вариант 1		Вариант 2	
$-\Delta_S^{OK}$	$+\Delta_S^{ПК}$	$+\Delta_S^{OK}$	$-\Delta_S^{ПК}$	$-\Delta_S^{OK}$	$+\Delta_S^{ПК}$	$+\Delta_S^{OK}$	$-\Delta_S^{ПК}$	$-\Delta_S^{OK}$	$+\Delta_S^{ПК}$
OK	ПК	OK	ПК	OK	ПК	OK	ПК	OK	ПК
5400	66	6540	59,4	5460	60,6	6060	54,6	5940	65,4
98,79	1,21	99,1	0,90	98,90	1,10	99,11	0,89	98,91	1,09
0,22	0,22	0,09	0,09	0,11	0,11	0,1	0,1	0,1	0,1
0,22	22,0	0,09	9,0	0,11	11,0	0,1	10,0	0,1	10,0



этом случае может быть рассчитана по уравнению (V.9). Анализ этого уравнения выполняли с помощью ЭВМ СМ-1300. В качестве исходных использовали экспериментальные данные, полученные на хроматографе «Цвет-530» с пламенно-ионизационным детектором при анализе искусственных 6-компонентных смесей, по качественному составу идентичных ацетонитрилу квалификации «для жидкостной хроматографии» (ацетонитрил, *трет*-бутанол, ацетон, нитрил акриловой кислоты и аллиловый спирт) с добавкой *втор*-бутанола, который принимали за «внутренний стандарт» в том случае, когда проводили количественную обработку хроматограмм этим методом. Содержание примесей составляло  $\approx 1\%$  (смесь № 1) и  $\approx 0,05\%$  (смесь № 2). Разделение осуществляли на колонке размером  $3 \times 3$  мм, заполненной целитом 545 с  $10\%$  нитрилотрипропионитрила, при температуре  $90^\circ\text{C}$  и расходе газа-носителя  $45$  мл/мин; объем вводимой пробы  $1$  мкл; температура испарителя  $130^\circ\text{C}$ .

Измерение площадей пиков проводили либо с помощью интегратора И-05, либо вручную, измеряя высоту пика с помощью металлической линейки, а ширину на половине высоты — с помощью лупы.

В указанных условиях для каждой смеси получено по 10 хроматограмм, из которых определяли среднеизмеренные значения градуировочных коэффициентов (относительно *втор*-бутанола), а также среднеизмеренные значения массовых долей ( $\bar{X}_i$ ) каждого примесного компонента и основного вещества, соответствующие значения средних квадратических отклонений  $s_x$ , неисключенные систематические составляющие  $\Theta_x$  суммарной погрешности и сами суммарные абсолютные ( $\Delta_x$ ) и относительные ( $\Delta_x^{\text{отн}}$ ) погрешности.

Анализ характера причин, обуславливающих суммарную погрешность, позволяет выявить случайную ( $s_x$ ) и неисключенную систематическую ( $\Theta_x$ ) составляющие  $\Delta_x$ . Суммарные погрешности установления градуировочных коэффициентов  $\Delta_K$  определяются предварительно на стадии градуировки. На стадии анализа (определения  $X_i$ )  $K_i$  — величины постоянные, и  $\Delta_K$  должны быть отнесены к неисключенной систематической составляющей  $\Delta_x$ . Суммарные погрешности измерения площади пиков  $\Delta_S$ , напротив, при исправной аппаратуре и исключении методических погрешностей могут рассматриваться как только случайные величины. Таким образом,  $s_x = f(\Delta_S)$  и  $\Theta_x = f(\Delta_K)$ .

Поскольку, как уже указывалось, результат вычисления  $X_i$  не зависит от погрешности дозирования пробы, то величину  $s_x$  определяли не по экспериментальным значениям измеряемых площадей пиков, а по вычисленным значениям на их основе массовых долей  $X_i$ . Для расчета  $\Theta_x$  пользовались уравнением (V.9) при условии, что  $\Delta_S = 0$ .

Проведено сопоставление характеристик погрешности результатов анализа, полученных при количественной обработке хроматограмм методами внутренней нормализации и внутреннего стандарта (внутренний стандарт — *втор-бутанол*) при  $n=10$  и  $P=0,95$  (см. с. 424—425).

Из представленных данных следует, что интегратор обеспечивает во всех случаях меньшую погрешность. Причем если величины  $\Theta_x$  при ручной и автоматической обработке хроматограмм различаются незначительно, то величины  $s_x$  в 1,5—10 раз выше при ручной обработке, чем при автоматической. Суммарные погрешности определения массовых долей примесей практически одинаковы как для внутренней нормализации, так и для внутреннего стандарта. Совершенно иная картина наблюдается при определении массовой доли основного компонента  $X_{OK}$ . При работе по методу «внутреннего стандарта» величину  $X_{OK}$  рассчитывают косвенным методом, вычитая из 100% сумму массовых долей примесей. Тогда погрешности определения  $X_{OK}$  приписывают погрешность определения суммы массовых долей примесей.

Прямое определение величины  $X_{OK}$  методом «внутреннего стандарта» в практике газохроматографического количественного анализа не используют, так как оно приводит к недопустимо большой погрешности измерения. Это, в частности, иллюстрируют представленные данные, где суммарная погрешность прямого определения ацетонитрила в смеси № 1 составила 2,8—7,8% и в смеси № 2 — 3,9—6,4%, в то время как суммарная погрешность косвенного определения — 0,04—0,16% и 0,003—0,006% соответственно.

При работе по методу внутренней нормализации можно выполнять и прямой расчет величины  $X_{OK}$  по формуле (V.8). В этом случае, как это видно из представленных данных, суммарная погрешность прямого определения ацетонитрила в смесях № 1 и № 2 составила соответственно 0,1—0,23 и 0,005—0,01%, что сопоставимо с результатами косвенного определения  $X_{OK}$  методом внутреннего стандарта.

На основании представленных данных можно говорить о правомерности прямого определения содержания основного вещества методом внутренней нормализации при строгом выполнении всех предъявляемых к этому методу требований, экспериментальную проверку выполнения которых можно предварительно осуществить с помощью предложенного Новаком метода контролируемой внутренней нормализации. Суть метода состоит в следующем. К анализируемой пробе массой  $m_a$ , компоненты которой идентифицированы (градуировочные коэффициенты известны), добавляют известное количество  $m_z$  не содержащегося в пробе и хорошо отделяемого на хроматограмме вещества с также известным градуировочным коэффициентом. Предположим, что часть пробы  $y$  не может быть определена (не элюирует из колонки, разлагается, остается в системе ввода из-за низкой летучести, не вызывает сигнала детек-

тора). Тогда массовую долю добавки  $Z$  ( $X_Z$ ) в пробе, если выразить вклад от  $y$  в общей расчетной формуле метода нормализации по аналогии с остальными составляющими как произведение двух множителей  $S_y K_y$ , рассчитывают по формуле:

$$X_Z = S_Z K_Z / \left( S_Z K_Z + S_y K_y + \sum_{i \neq Z, y}^N S_i K_i \right)$$

Индекс  $j$  относится к любому компоненту анализируемой смеси, за исключением  $z$  и  $y$ . Массовая доля ( $X_y$ ) гипотетической непроявляемой на хроматограмме части пробы  $y$  после добавки к пробе контрольного вещества составляет:

$$X_y = S_y K_y / \left( S_Z K_Z + S_y K_y + \sum_{i \neq z, y}^N S_i K_i \right).$$

После подстановки  $S_y K_y$  из уравнения для  $X_Z$  и преобразований получаем:

#### Метод внутренней нормализации

Компонент	трет-Бу-танол	Ацетон	втор-Бу-танол	Нитрил акриловой кислоты	Аллиловый спирт	Ацетонитрил
Смесь № 1 «введено», %	0,84	0,90	0,90	1,00	1,01	95,35

#### Ручная обработка

$\bar{X}_i$	0,86	0,91	0,90	0,99	1,02	95,32
$s_X$	0,02	0,04	0,03	0,03	0,01	0,07
$\Theta_X$	0,03	0,05	0,03	0,04	0,04	0,15
$\Delta_X$	0,05	0,09	0,07	0,08	0,06	0,22
$\Delta_X^{\text{отн}}$	5,8	10	7,6	7,7	5,5	0,23

#### Интегратор И-05

$\bar{X}_i$	0,84	0,90	0,90	1,01	1,02	95,32
$s_X$	0,006	0,006	0,007	0,006	0,008	0,03
$\Theta_X$	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02	0,07
$\Delta_X$	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,1
$\Delta_X^{\text{отн}}$	2,6	2,6	2,6	2,6	2,8	0,1
Смесь № 2 «введено», %	0,038	0,041	0,040	0,045	0,046	99,79

#### Ручная обработка

$\bar{X}_i$	0,038	0,040	0,040	0,045	0,045	99,79
$s_X$	0,001	0,001	0,0007	0,001	0,001	0,004
$\Theta_X$	0,002	0,001	0,001	0,002	0,002	0,006
$\Delta_X$	0,003	0,003	0,002	0,003	0,003	0,01
$\Delta_X^{\text{отн}}$	8,6	8,2	4,5	7,6	7,6	0,01

#### Интегратор И-0,5

$\bar{X}_i$	0,038	0,041	0,041	0,046	0,046	99,79
$s_X$	0,0004	0,0004	0,0005	0,0005	0,0006	0,002

# Интегратор И-0,5

$\Theta_X$ . . . . .	0,001	0,001	0,0007	0,001	0,002	0,004
$\Delta_X$ . . . . .	0,001	0,001	0,001	0,002	0,002	0,005
$\Delta_X^{\text{отн}}$ . . . . .	3,6	3,4	3,2	3,4	5,1	0,005

## Метод внутреннего стандарта

Компонент . . .	трет-Бу-танол	Ацетон	Нитрил акрило-вой кис-лоты	Аллиловый спирт	Ацетонитрил прямое опреде-ление	косвен-ное опре-деление 100— $\Sigma X_i$
-----------------	---------------	--------	----------------------------	-----------------	---------------------------------	---

Смесь № 1 «введено», % . . .	0,85	0,91	1,01	1,02	96,21	
---------------------------------	------	------	------	------	-------	--

## Ручная обработка

$\bar{X}_i$ . . . . .	0,88	0,95	1,05	1,07	100,1	96,05
$s_X$ . . . . .	0,02	0,04	0,02	0,04	3,2	—
$\Theta_X$ . . . . .	0,03	0,04	0,04	0,04	3,7	—
$\Delta_X$ . . . . .	0,06	0,09	0,06	0,09	7,8	0,15
$\Delta_X^{\text{отн}}$ . . . . .	6,5	9,9	6,0	7,9	7,8	0,16

## Интегратор И-05

$\bar{X}_i$ . . . . .	0,87	0,94	1,05	1,06	99,2	96,08
$s_X$ . . . . .	0,002	0,001	0,004	0,003	0,77	—
$\Theta_X$ . . . . .	0,02	0,02	0,02	0,02	2,0	—
$\Delta_X$ . . . . .	0,02	0,02	0,02	0,02	2,8	0,04
$\Delta_X^{\text{отн}}$ . . . . .	1,9	2,0	2,3	2,1	2,8	0,04

Смесь № 2 «введено», % . . .	0,038	0,041	0,045	0,046	99,83	
---------------------------------	-------	-------	-------	-------	-------	--

## Ручная обработка

$\bar{X}_i$ . . . . .	0,039	0,042	0,046	0,047	103,2	99,83
$s_X$ . . . . .	0,001	0,001	0,001	0,0007	2,74	—
$\Theta_X$ . . . . .	0,001	0,001	0,002	0,002	3,08	—
$\Delta_X$ . . . . .	0,003	0,003	0,003	0,002	6,85	0,006
$\Delta_X^{\text{отн}}$ . . . . .	8,4	7,9	7,2	4,6	6,4	0,006

## Интегратор И-0,5

$\bar{X}_i$ . . . . .	0,039	0,042	0,046	0,046	102,4	99,83
$s_X$ . . . . .	0,0004	0,0002	0,001	0,001	1,53	—
$\Theta_X$ . . . . .	0,0009	0,0008	0,001	0,001	2,3	—
$\Delta_X$ . . . . .	0,001	0,001	0,001	0,001	4,0	0,003
$\Delta_X^{\text{отн}}$ . . . . .	3,2	2,3	3,0	3,0	3,9	0,003

$$X_y = 1 - X_Z \left( 1 + \sum_{j \neq y, Z}^N S_j K_j / S_Z K_Z \right).$$

С учетом исходной массы анализируемой пробы  $m_a$  весовая доля добавки

Равенство  $X_y$  нулю означает, что все компоненты анализируемой смеси зарегистрированы на хроматограмме.

Возможно также полноту регистрации на хроматограмме компонентов приближенно оценивать по постоянству соотношения  $\left(\sum_{i=1}^N K_i S_i\right)/q$  (где  $q$  — количественная характеристика — масса или объем — вводимой пробы). Это соотношение может быть установлено при градуировке, а затем проверяться при непосредственном проведении анализов.

#### 3.4. МЕТРОЛОГИЧЕСКАЯ АТТЕСТАЦИЯ МЕТОДИК ВЫПОЛНЕНИЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ИЗМЕРЕНИЙ

В соответствии с нормативными документами [109, 110] пересматриваемые и вновь разрабатываемые методики выполнения хроматографических измерений должны метрологически аттестовываться. Цель аттестации — установление значений характеристик погрешности, выполняемых по методике измерений, и проверка их соответствия нормам точности измерений. Подходы к оценке характеристик погрешности основных методов количественного анализа были рассмотрены в соответствующих разделах. Ниже представлены результаты метрологической аттестации конкретной методики анализа — газохроматографического определения методом внутреннего стандарта органических примесей в диметилфталате особой чистоты. Последовательность экспериментальных этапов и расчетных процедур (в соответствии с программой, изложенной в МУ 6—09—30—87) состояла в следующем: 1) приготовление смеси для установления градуировочных коэффициентов ( $K_i$ ) и ее аттестация; 2) градуировка прибора по аттестованной смеси и вычисление  $K_i$ ; 3) установление характеристик погрешности определения  $K_i$  каждого компонента смеси (расчет среднего квадратического отклонения СКО  $s_K$  единичного измерения  $K_i$ , проверка на промахи, расчет СКО  $s_K$  среднеизмеренной величины  $K_i$ , определение неисключенной составляющей систематической погрешности  $\Theta_k$ , вычисление суммарной погрешности  $\Delta_k$ ); 4) установление характеристик погрешности измерения массовых долей примесей  $X_i$  в анализируемом объекте для каждой примеси, расчет СКО  $s_X$  единичного измерения  $X_i$ , проверка на промахи, расчет СКО  $s_X$  среднеизмеренной величины  $X_i$ , определение неисключенной составляющей систематической погрешности  $\Theta_X$ ; 5) для суммарного содержания примесей вычисление  $\Delta_X$  и допускаемого расхождения между результатами двух параллельных определений  $d$ .

Анализ диметилфталата проводили на газовом хроматографе «Цвет-100» с пламенно-ионизационным детектором и металлическими колонками длиной 2 м и диаметром 3 мм. Колонки заполняли хроматоном N-AW (0,16—0,20 мм) с 5% SP-2250; использовали изотермический режим при  $165 \pm 5^\circ \text{C}$ ; расход газа-носителя (азота) составлял 45—50 мл/мин; пробу дозировали микрошприцем МШ-10 в нагретый до  $230^\circ \text{C}$  испаритель; объем пробы — 0,5—1,0 мкл. Измерения площадей пиков выполняли вручную. На рис. V.6 представлена хроматограмма образца диметилфталата квалификации «осч», содержащего 0,15% органических примесей, с добавкой (0,2%) используемого в качестве внутреннего стандарта диэтилфталата. Идентифицированные примеси — метилэтилфталат и дипропилфталат по нормативно-технической документации не выпускаются, поэтому они не могли быть использованы для приготовления аттестованной смеси. Исходя из химической природы этих веществ, можно было предположить, что относительные значения градуировочных коэффициентов в гомологическом ряду будут незначительно различаться. Поэтому было принято допущение о возможности проведения градуировки прибора по бинарной смеси основного вещества с внутренним стандартом и приравнивания найденного градуировочного коэффициента для диметилфталата величинам  $K_i$  для примесных компонентов.

Аттестуемая по процедуре приготовления градуировочная смесь содержала по 0,2% диметилфталата и диэтилфталата в растворе этанола при навесках 0,03—0,04 г. В условиях методики выполнения измерений получено близкое к 1 значение градуировочного коэффициента (0,97), что подтверждает приемлемость принятого допущения о незначительном изменении величин  $K_i$  в гомологическом ряду фталатов.

Снимали 20 хроматограмм аттестованной смеси, из которых вычисляли показатели точности определения градуировочного коэффициента (табл. V.11). При сопоставлении границ неисключенной систематической погрешности результата измерения  $K_i$  со случайной погрешностью неравенство  $8 > > (\Theta/s) > 0,8$  удовлетворялось. Поэтому суммарную погрешность результата определения  $K_i$  находили путем построения композиции распределений случайных и рассматриваемых как

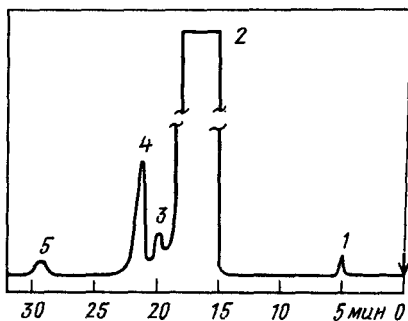


Рис V.6. Хроматограмма образца диметилфталата осч.:

1 — неидентифицированная примесь, 2 — диметилфталат, 3 — метилэтилфталат, 4 — диэтилфталат (внутренний стандарт), 5 — дипропилфталат

*Таблица V.11. Характеристики погрешности определения  
градуировочного коэффициента диметилфталата по диэтилфталату  
( $n=19$ ,  $P=0,95$ )*

Показатель	Диметилфталат
Среднее значение, $\bar{K}$	0,97
СКО единичного определения, $s_K$	0,03
СКО среднеизмеренной величины, $s_{\bar{K}}$	0,01
Неисключенная систематическая погрешность, $\Theta_K$	0,02
Суммарная погрешность, $\Delta_K$	0,03
Относительная суммарная погрешность ( $\Delta_K/\bar{K}$ ) · 100, %	3

*Таблица V.12. Характеристики погрешности методики выполнения измерений  
содержания органических примесей в диметилфталате  
( $n=5$ ,  $P=0,95$ )*

Показатель	Неидентифицированный компонент	Метилэтилфталат	Дипропилфталат	Сумма примесей
$\bar{X}$	0,031	0,025	0,087	0,143
$s_X$	0,003	0,005	0,006	0,008
$\Theta_X$	0,002	0,001	0,005	—
$\Delta_X$	0,003	0,008	0,00	0,012
( $\Delta_X/\bar{X}$ ) · 100, %	9,7	32,0	10,3	8,4
Допускаемое расхождение между результатами двух параллельных определений, $d$	0,012	0,016	0,016	0,031
Относительное $d$ , ( $d/\bar{X}$ ) · 100, %				16

случайные величины неисключенных систематических погрешностей.

Для определения содержания примесей снято 5 хроматограмм диметилфталата с добавкой внутреннего стандарта (см. рис. V.6). Результаты вычисления характеристик погрешности для каждой примеси и для их суммарного содержания представлены в табл. V.12. Суммарную погрешность для неидентифицированной примеси и для дипропилфталата находили путем построения композиции распределений случайных и неисключенных систематических погрешностей, т. е. обе составляющие были соизмеримы. Для метилэтилфталата, который регистрируется в виде небольшого пика (0,025%) на «хвосте» основного вещества (см. рис. V.6), случайная погрешность оказалась настолько большой, что систематическая составляющая можно было пренебречь.

Из представленных данных видно, что относительные погрешности определения  $K$  невелики (3%), так как компоненты градуировочной смеси регистрировались на хроматограмме в виде полностью разрешенных пиков, обработка которых не представляла особых трудностей. В то время как при измерении содержания

отдельных примесей относительные погрешности составляли 10—30%, поскольку пики примесных компонентов регистрировались на хвосте пика основного вещества, наибольшая погрешность отмечена для пика метилэтилфталата.

### 3.5. КОНТРОЛЬ ТОЧНОСТИ ИЗМЕРЕНИЙ

Заключительным и наиболее сложным разделом документа по методике выполнения измерений [109] является раздел контроля точности измерений. Необходимой исходной предпосылкой получения правильных результатов анализа и доказательства их правильности является стабильность аналитического процесса, т. е. устойчивая близость повторных результатов анализа одних и тех же однородных проб. Выявление источников погрешностей, определяющих правильность, и само доказательство правильности крайне затруднены в условиях недостаточной стабильности процесса анализа. Поэтому контроль сходимости — первый этап контроля правильности методики. Оперативный контроль реализуется путем выполнения двух или более параллельных определений, различие между результатами которых не должно превышать некоторого установленного при метрологической аттестации значения  $d$ .

Поскольку стабильность сама по себе не гарантирует правильность (можно устойчиво получать и неверные результаты), возникает необходимость в использовании специальных способов для доказательства правильности. Рассмотрим на основе данных, представленных в монографии Шаевича А. Б., сущность, возможности и ограничения таких способов [101].

1. Использование независимых методов. Этот подход основан на предположении об относительно малой вероятности появления одинаковых по знаку и близких по значению погрешностей при использовании различных методов. Эффективность этого способа возрастает по мере увеличения числа привлекаемых методов. Ограничения — возможность корреляции результатов, полученных разными методами, и трудности выбора независимых методов.

2. Привлечение нескольких лабораторий одного уровня компетентности. Эффективность межлабораторного эксперимента возрастает по мере увеличения числа лабораторий, если среди них нет существенно менее компетентных. Однако при значительных расхождениях в результатах трудно решить, какие из них более правильные, так как подход по принципу «большинства голосов» не всегда оправдан. Возможна также общая погрешность в результатах всех или части лабораторий.

3. Сравнение с результатами, полученными в авторитетной лаборатории. Использование подобных результатов в качестве реперных имеет основание, когда в такой лаборатории применяют лучшие методы, аппаратуру, реактивы, реализуют более строгие меры предосторожности (например, для предотвращения загряз-



нения из внешней среды при анализе чистых веществ), к выполнению анализов привлекается более квалифицированный персонал, используют более совершенную технику обработки данных.

4. Использование образцовых (референтных) методов. Образцовое средство измерения определяют как служащее для поверки по нему других средств и утвержденное в таком качестве. По аналогии образцовыми являются методы, дающие возможность получать результаты, надежность которых проверена, доказана и достаточна для той или иной цели.

5. Использование абсолютных и «безэталоновых» методов. Абсолютными называют методы, при использовании которых значение измеренной величины устанавливают непосредственно в основных единицах измерений на основе описываемой фундаментальными уравнениями функциональной связи искомой величины с такими единицами.

6. Использование образцовых приборов. Проводят сравнение с результатами на поверенных приборах более высокого класса точности.

7. Определение суммы содержаний. Способ основан на логической посылке о том, что в случае выполнения полного анализа вещества сумма результатов определения содержаний всех компонентов должна быть достаточно близкой к 100%. Метрологически этот способ не всегда обоснован, так как получение значения, близкого к 100%, может быть следствием взаимной компенсации погрешностей при суммировании отдельных результатов. Как вариант способа можно использовать материальный баланс исследуемого технологического процесса.

8. Использование материального баланса технологического процесса или балансовой пробы. На основании полученных аналитических данных составляют материальный баланс контролируемого технологического процесса. Если баланс не сходится, то необходимо проверить правильность всех или части результатов. Сходимость баланса не должна некритически интерпретироваться как доказательство правильности, так как возможна компенсация погрешностей определения концентраций в различных потоках или все результаты могут быть занижены или завышены.

В случае применения так называемых балансовых проб анализируемую пробу точно разделяют на несколько частей и каждую часть анализируют отдельно. Сумма найденных абсолютных количеств определяемого компонента должна с достаточным приближением совпасть с количеством, содержавшимся в исходной неразделенной пробе.

9. Варьирование размера проб. Способ основан на анализе частных проб, величина которых изменяется в известное число раз. Пусть имеется возрастающий ряд навесок массой  $M_1, M_2, \dots, M_i, \dots, M_n$ , а также ряд количества определяемого компонента в указанных навесках  $m_1, m_2, \dots, m_i, \dots, m_n$ . При отсутствии погреш-

ности, пропорциональной количеству определяемого компонента,  $m_1/M_1 = m_2/M_2 = m_i/M_i = m_n/M_n$ .

При наличии такой погрешности отношения  $m_i/M_i$  в их рядах будут возрастать или убывать в зависимости от того, занижены или завышены результаты.

10. Способ добавок. Одно из необходимых условий эффективного использования этого известного способа — наличие стандартных образцов или высокочистых реактивов.

11. Учет данных холостого опыта. Сущность способа — выполнение всех операций анализа без пробы. Пренебрежимая малость найденного содержания или достаточно точный его учет введением соответствующей поправки в результаты анализа проб могут служить одним из свидетельств правильности.

12. Использование данных о стабильности общего среднего. Этот способ применим к объектам, для которых априорно известно среднее значение или интервал варьирования содержания определяемого компонента в некотором множестве проб и указанные величины, по сути задачи, существенно изменяться не могут.

13. Использование составных смесей и растворов. Суть способа — использование смесей известного состава с той или иной полнотой моделирующих композицию проб. Состав таких смесей устанавливают по процедуре приготовления. Если качество указанных смесей как средств контроля и доказательства правильности удостоверено официально, то их применяют как одну из разновидностей стандартных образцов.

14. Использование надежно проанализированных веществ. Использование анализа для установления содержания компонентов в веществах, служащих для контроля и доказательства правильности, в общем позволяет в большей мере обеспечивать адекватность таких веществ пробам, чем в случае использования составных композиций. В наибольшей степени качество таких веществ обеспечивается, если их изготавливают, исследуют и аттестуют как стандартные образцы. Преимущества доказательства правильности на основе использования стандартных образцов общеизвестны [111]. Ограничениями в ряде важных случаев являются неполная адекватность таких образцов анализируемым пробам, отсутствие образцов, длительность цикла их разработки и аттестации и др.

Можно заключить, что универсальным является лишь основополагающий принцип — сравнение в конечном счете с веществом, содержание определяемого компонента в котором известно более достоверно, чем это требуется от результата контролируемого анализа, при условии, что при таком сравнении действие обстоятельств, могущих исказить результат сравнения, исключено с достаточной полнотой. Каждый из конкретных рассмотренных способов контроля точности имеет свои предпочтительные области применения и ограничения. Поэтому удовлетворительные результаты чаще всего могут быть получены путем объективного сравне-

ния альтернативных вариантов, комбинирования нескольких способов, а также сочетания всего этого с квалифицированным рассмотрением методик и условий выполнения анализов.

Таким образом, доказательство правильности методики выполнения измерений — нетривиальная процедура, которая требует наличия не только соответствующих способов и средств, но и глубоких профессиональных знаний в области количественного анализа и смежных научных дисциплин.

В заключение раздела, посвященного количественному анализу, необходимо подчеркнуть острую нехватку методических пособий по метрологическому обеспечению хроматографических измерений. Разработка конкретных программ метрологической аттестации с упрощающими допущениями, делающими их приемлемыми для практического использования, остается весьма актуальной задачей для аналитиков и метрологов.

## ПРИЛОЖЕНИЯ

### ПРИЛОЖЕНИЕ I

1 Значения  $\beta$  для числа параллельных определений  $n$  при уровне значимости  $P=0,95$ :

$n$	3	4	5	6	7	8	9	10	15	20
$\beta$	1,15	1,46	1,67	1,82	1,94	2,03	2,11	2,18	2,41	2,56

2 Коэффициент  $k$  в зависимости от числа степеней свободы  $f=n-1$  и числа параллельных определений  $n$

$f$	Значение $k$ при числе параллельных определений $n$								
	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	17,969	26,98	32,82	37,08	40,41	43,12	45,40	47,36	49,07
2	6,085	8,33	9,80	10,88	11,74	12,44	13,03	13,54	13,99
3	4,501	5,91	6,82	7,50	8,04	8,48	8,85	9,18	9,46
4	3,926	5,04	5,76	6,29	6,71	7,05	7,35	7,60	7,83
5	3,635	4,60	5,22	5,67	6,03	6,33	6,58	6,80	6,99
6	3,460	4,34	4,90	5,30	5,63	5,90	6,12	6,32	6,49
7	3,344	4,16	4,68	5,06	5,36	5,61	5,82	6,00	6,16
8	3,261	4,04	4,53	4,89	5,17	5,40	5,60	5,77	5,92
9	3,199	3,95	4,41	4,76	5,02	5,24	5,43	5,59	5,74

3 Значение коэффициента  $t$  для случайной величины, имеющей распределение Стьюдента с  $f=n-1$  степенями свободы при уровне значимости  $P=0,95$ :

$f$	1	2	3	4	5	6	7	8	9
$t$	12,706	4,303	3,182	2,776	2,571	2,447	2,365	2,306	2,262

## **ПРИЛОЖЕНИЕ II. Типовая методика приготовления смесей, применяемых для метрологической аттестации и контроля точности методик выполнения хроматографических измерений**

Настоящая типовая методика распространяется на приготовление смесей в случае отсутствия государственных стандартных образцов для установления норм точности измерений (пункт 1.5 ГОСТ 8.505—84). Смесей подлежат аттестации по процедуре их приготовления. Аттестованная смесь может служить средством установления норм точности при метрологической аттестации (МА) методик выполнения измерений и выходном контроле в ЦЗЛ. В качестве веществ, используемых в смесях, разрешается использовать только вещества, выпускаемые серийно по соответствующей нормативно-технической документации (НТД). При этом следует выбирать те из квалификаций, которые имеют узкие интервалы допуска на содержание основного вещества. В случае отсутствия в ТУ допуска следует стремиться использовать реактивы с содержанием основного вещества, наиболее близким к 100%.

### **1. Назначение и область применения**

Методика позволяет готовить смеси, применяемые для определения градуировочных коэффициентов, а также для контроля точности газохроматографических измерений содержаний массовых долей примесей с использованием метода внутреннего стандарта. Методика позволяет готовить смеси, содержащие измеряемые компоненты на уровне от 1 до 0,001% (масс.).

### **2. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы**

Приводится перечень, при этом указывается: для весов — тип и максимальная погрешность; для веществ, входящих в смеси, — содержание основного вещества и допускаемая погрешность его содержания в соответствии с ГОСТ или ТУ. Желательно использовать хроматографически чистые вещества. При этом может оказаться, что в НТД указано: «...содержание основного вещества ( $N$ ) не менее (например) 99,8%...». В этом случае следует принять, что основное вещество может принимать значения от 100 до 99,8%. Разницу до 100% делят пополам и считают, что содержание основного вещества составляет  $99,9 \pm 0,1\%$ . Если  $N$  по НТД менее 98%, то следует учитывать фактическую погрешность содержания основного вещества.

Для остальной лабораторной посуды, как не влияющей на погрешность метода, достаточно простого перечисления без ссылок на ГОСТ или ТУ

### **3. Процедура приготовления**

Для проведения градуировки прибора готовят смесь, содержащую все определяемые компоненты и вещества, принятые за внутренний стандарт. Массовая доля каждого компонента должна быть того же порядка, что и измеряемые примесью компоненты в анализируемом продукте. Для этого предварительно проводят приближенную количественную оценку содержания примесей, например методом внутренней нормализации без градуировочных коэффициентов. На основании полученных данных рассчитывают количество растворителя, необходимое для получения требуемых массовых долей примесей. В качестве растворителя используют вещество, не содержащее определяемых примесей, желательно близкой химической природы к анализируемому веществу.

Смеси готовят гравиметрическим методом. Все взвешивания проводят на аналитических весах, записывая результат взвешивания с точностью до четвертого десятичного знака.

Процедура приготовления смеси состоит в следующем: взвешивают пустую склянку и записывают результат взвешивания  $m$ . Лучше использовать флаконы из дробта для медпрепаратов по ТУ 64—2—10—68 (пенициллиновые склянки) с плотно входящими в них полиэтиленовыми пробками по ТУ 64—2—232—83.

Затем во флакон с помощью пипетки вносят 3—5 мл вещества растворителя. При этом внимательно следят, чтобы вещество с носика пипетки не размазывалось по стенкам и не попадало на горло флакона во избежание попадания его на пробку. Проводят взвешивание и записывают результат взвешивания  $m_i$ .

В дальнейшем все манипуляции с флаконом, в который уже введен растворитель, проводят так аккуратно, чтобы жидкость не попадала на пробку.

Затем с помощью микропипетки или микрошприца добавляют поочередно все определяемые компоненты и вещество, принятое за внутренний стандарт, записывая для каждого значение результата взвешивания  $m_{i+1}$ . При этом внимательно следят за тем, чтобы носик микропипетки или конец иглы шприца не соприкасались с содержимым флакона во избежание уноса и искажения массы, а также за тем, чтобы добавляемое вещество не размазывалось по горлышку флакона.

В том случае, когда в качестве растворителя используют легколетучее вещество (этанол, ацетон), а определяемые компоненты не являются легколетучими, можно сначала вносить во флакон определяемые вещества, а затем уже растворитель. В смеси, используемой для градуировки прибора, точную массу растворителя знать не обязательно, важно только, чтобы его количество определяло требуемые массовые доли примесей. Предварительными расчетами можно приблизительно оценить, что при добавлении к 5 мл основы (растворителя или анализируемой пробы) 40—50 мкл тестового вещества получают смесь, содержащую около 1% тестового вещества. Для получения смесей, содержащих добавляемый компонент на уровне сотых или тысячных долей процента, используют метод двойного разбавления. Он заключается в том, что заранее рассчитанное количество смеси из первого флакона вносят во второй флакон, содержащий 3—5 мл растворителя. Рассчитывают содержание каждого компонента (в г) во втором флаконе.

Процедура приготовления смеси анализируемого вещества с веществом, принятым за внутренний стандарт, аналогична процедуре приготовления смеси для градуировки прибора.

#### 4. Алгоритм расчета характеристик погрешности установления значений содержания компонентов смеси (в г)

Суммарную погрешность определяют как сумму погрешности содержания основного вещества в соответствии с НТД и неисключенной систематической погрешности процедуры гравиметрического приготовления смеси по формуле (ГОСТ 8.207—76):

$$\Theta = k \sqrt{\Theta_b^2 + \Theta_{\text{ТУ}}^2},$$

где  $k$  — коэффициент, принимаемый равным 1,1 при доверительной вероятности  $P=0,95$ ;  $\Theta_b$  — погрешность взвешивания;  $\Theta_{\text{ТУ}}$  — погрешность, учитывающая содержание основного вещества.

4.1. Массу каждого вещества, введенного в смесь, определяют как разность результатов двух взвешиваний:

$$m_i = m'_{i+1} - m'_i.$$

Неисключенную систематическую погрешность рассчитывают по формуле:

$$\Theta_b = 1,1 \sqrt{(\Delta_{m_{i+1}})^2 + (\Delta_{m_i})^2}.$$

Погрешность взвешивания на аналитических весах ( $\Delta_m$ ) принимают равной 0,0002 г.

Таким образом,

$$\Theta_b = 1,1 \sqrt{(0,0002)^2 + (0,0002)^2} = 0,00028 \text{ г}.$$

Погрешность НТД ( $\Theta_{\text{ТУ}}$ ) определяют следующим образом: принимают погрешность содержания основного вещества равной половине интервала между номинальным значением по НТД ( $N$ ) и теоретически возможным содержанием основного вещества, равным 100.

Тогда погрешность содержания основного вещества в массе  $m_i$  рассчитывают по формуле:

$$\Theta_{\text{ту}, m_i} = m_i (100 - N) / (2 \cdot 100).$$

Суммарную погрешность  $\Theta$ , вычисляют по формуле:

$$\Theta_i = 1,1 \sqrt{(0,00028)^2 + [m_i (100 - N) / (2 \cdot 100)]^2}.$$

Таким образом, содержание (в г) каждого компонента аттестованной смеси записывают в следующей форме:

$$m_i \pm \Theta_i.$$

Массовую долю (в %) каждого компонента аттестованной смеси вычисляют по формуле:

$$X_i = m_i \cdot 100 / \sum_{i=1}^n m_i.$$

### **ПРИЛОЖЕНИЕ III. Типовая методика выполнения газохроматографических измерений содержаний компонентов проб химических органических продуктов**

Порядок изложения типовой методики выполнения измерений (МВИ) соответствует требованиям ГОСТ 8.504—84. Типовая МВИ распространяется на измерение содержания компонентов в смесях органических веществ, содержания примесей в продуктах и суммарного содержания примесей.

#### **1. Вводная часть**

Во вводной части должны быть установлены назначение и область применения МВИ.

#### **2. Нормы точности измерений и метод измерений**

2.1. Показателем точности измерения (анализа) являются пределы допускаемого значения суммарной погрешности результата измерений ( $\pm \Delta_X$ ) при доверительной вероятности 0,95. Нормативом оперативного контроля сходимости результата измерений является допускаемое расхождение между результатами двух параллельных определений ( $d$ ), а также пределы допускаемого значения суммарной погрешности измерения градуировочных коэффициентов ( $\pm \Delta_K$ ) при доверительной вероятности 0,95.

Предельно допустимые значения величин  $\Delta_X$ ,  $d$  и  $\Delta_K$  задаются на стадии разработки методики анализа конкретного продукта и (или) устанавливаются при ее метрологической аттестации.

2.2. Газохроматографические измерения состава органических химических продуктов выполняют на аналитических газовых хроматографах путем разделения анализируемой смеси в сорбционной колонке и детектирования разделенных компонентов с последующей регистрацией сигналов детектора либо на ленте самописца в виде хроматограммы с измерением параметров пиков вручную, либо в цифровой форме с помощью автоматического интегратора. Из полученных данных рассчитывают значения массовой доли каждого компонента.

#### **3. Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы**

3.1. В перечне средств измерений и вспомогательных устройств следует, наряду с наименованием, указывать обозначения стандартов на них. Обязательно указание материала, длины и диаметра аналитических колонок.

3.2. В перечне реактивов и материалов, включающем стандартные образцы и серийно выпускаемые смеси веществ, следует указывать их квалификацию, сорт

и марку со ссылкой на НТД, в соответствии с требованиями которой они выпускаются.

#### **4. Требования безопасности**

4.1. При выполнении газохроматографических измерений состава органических химических продуктов следует соблюдать правила безопасной работы на хроматографе, изложенные в инструкции по эксплуатации хроматографа, правила безопасной работы в химической лаборатории и правила безопасной работы с анализируемыми веществами, изложенными в методике анализа конкретного продукта.

4.2. При приготовлении сорбентов по п. 7.1 следует выполнять правила безопасной работы с легковоспламеняющимися и горючими жидкостями, используемыми в качестве растворителей для нанесения неподвижной фазы. Выпаривание растворителя следует вести в вытяжном шкафу. При необходимости просеивания твердого носителя или готового сорбента работать в респираторе, просеивание проводить под вытяжным шкафом или вытяжным зонтом. Работа по приготовлению сорбента, подготовке проб и выполнению анализов при неисправной или неработающей вытяжной вентиляции запрещается.

#### **5. Требования к квалификации оператора**

К выполнению газохроматографических измерений состава органических химических продуктов допускаются лица, имеющие квалификацию лаборанта или техника-химика, прошедшие обучение газохроматографическим методам анализа, имеющие опыт работы в данной области и ознакомленные с инструкцией по эксплуатации хроматографа и методикой анализа конкретного продукта.

#### **6. Условия выполнения измерений**

6.1. Понятие «условия выполнения измерений» применительно к газохроматографическим измерениям состава включает следующие характеристики и величины, подлежащие обязательному указанию в методике анализа.

6.1.1. Состав и зернение сорбента (марка твердого носителя или адсорбента, марка неподвижной фазы, процент неподвижной фазы на твердом носителе).

6.1.2. Температура колонки (термостата колонок) или в случае использования режима с программированием температуры — начальная и конечная температура программы и скорость подъема температуры.

6.1.3. Температура испарителя.

6.1.4. Температура детектора, если он специально подогревается или термостатируется.

6.1.5. Расход газа-носителя и расходы вспомогательных газов, если таковые используются.

6.1.6. Рекомендуемый объем пробы.

6.1.7. Рекомендуемые характеристики чувствительности системы детектирования и регистрации (ток детектора, предел детектирования, характеристики аттенюирования сигнала, если их изменяют в процессе анализа, и т. д.).

6.1.8. Скорость диаграммной ленты самописца.

6.1.9. Параметры удерживания компонентов (примесей) анализируемой смеси (продукта) — отношения неисправленных времен удерживания компонентов к неисправленному времени удерживания основного компонента или внутреннего стандарта.

6.1.10. Метод расчета массовых долей компонентов (примесей) анализируемого продукта (метод абсолютной градуировки, внутреннего стандарта или внутренней нормализации).

6.1.11. Наименование внутреннего стандарта и его количество, вводимое в анализируемую пробу, если применяется метод внутреннего стандарта.

6.1.12. Рекомендуемые (справочные) значения градуировочных коэффициентов для компонентов анализируемого продукта.

6.1.13. Требования к физическим параметрам окружающей среды, влияющим на результаты анализа, если эти требования не оговорены инструкцией по эксплуа-

тации хроматографа или отличаются от оговоренных требований.

6.1.14. Минимально допустимое значение характеристики эффективности и условия его определения (определяют по п. 7.3), если на точность анализа конкретного продукта может оказать существенное влияние эффективность колонки (число теоретических тарелок по какому-либо компоненту или критерий разделения пары компонентов).

6.2. Условия выполнения измерений подлежат проверке и при необходимости корректировке.

6.2.1. При переходе на другой хроматограф.

6.2.2. После замены колонки.

6.2.3. После ремонта узлов хроматографа, влияющих на чувствительность (детектора, усилителя, системы аттенюирования сигнала, систем подачи газа в колонку и на детектор).

## 7. Подготовка к выполнению измерений

7.1. Приготовление сорбента. При отсутствии готового сорбента его готовят следующим образом. Отвешивают в фарфоровую выпарную чашку твердый носитель (при необходимости предварительно отсеянный), в химический стакан — неподвижную фазу. Количества носителя и фазы должны быть указаны в методике анализа. Взвешивают, как правило, с точностью до 0,05 г. Растворяют неподвижную фазу в избытке растворителя и полученным раствором заливают твердый носитель. Добавляют в чашку растворитель в таком количестве, чтобы над носителем был слой жидкости высотой 3—5 мм, и тщательно перемешивают массу шпателем. Устанавливают лампу для инфракрасной сушки так, чтобы низ лампы был на высоте 30—35 см над плитой штатива, и помещают выпарную чашку на плиту. Упаривают растворитель досуха при перемешивании, после чего выдерживают сорбент под лампой 30 мин. Готовый сорбент должен быть на ощупь сухим и свободно пересыпаться.

Сорбент охлаждают на воздухе и помещают в тару с плотно закрывающейся крышкой.

Допускается упаривание растворителя на водяной бане с последующим высушиванием в сушильном шкафу.

7.2. Заполнение колонок и кондиционирование. U-Образные металлические хроматографические колонки, соединяющиеся по секциям, заполняют небольшими порциями сорбента, засыпаемого через специальные воронки параллельно в оба конца каждой секции. Для равномерного уплотнения во время заполнения по колонке слегка постукивают сбоку деревянным предметом либо используют микровибратор. В заполненные секции помещают с обеих концов кусочки стекловаты или сетки из нержавеющей стали.

Для равномерного заполнения спиральных металлических и стеклянных колонок используют вакуум. При этом выходной конец колонки, присоединяемый к вакуумной линии, закрывают мелкой капроновой или металлической сеткой. На втором конце колонки укрепляют воронку, через которую медленно засыпают сорбент. В течение всего процесса заполнения постукивают по колонке сбоку деревянным предметом или используют микровибратор.

Контроль полноты заполнения колонки проводят путем сопоставления объема пустой колонки и объема использованного для заполнения сорбента. Для измерения объема сорбента его засыпают в мерный цилиндр и уплотняют, постукивая дном цилиндра о горизонтальную поверхность. Рекомендуется также измерить массу сорбента в колонке путем взвешивания ее до и после заполнения.

Заполненную колонку устанавливают в термостат хроматографа, присоединяя один конец ее к испарителю, а второй оставляя свободным. Колонку кондиционируют при температуре на 15—20 °C выше температуры, указанной в условиях анализа, но не выше верхнего температурного предела применения неподвижной фазы, определяемой по справочным данным. Поток газа-носителя при кондиционировании должен составлять от 70 до 100% значения, указанного в условиях анализа.

Через 3—4 ч присоединяют к выходу колонки детектор и продолжают кондиционирование до получения стабильной нулевой линии детектора на максимальной



чувствительности, требуемой по условиям анализа. Стабильность нулевой линии оценивают по паспортным данным хроматографа.

7.3. Определение характеристик эффективности колонки (допускается исключение разд. 7.3). Характеристики эффективности колонки определяют при условиях, указанных в методике анализа.

7.3.1. Определение числа теоретических тарелок ( $N$ ). Вводят в хроматограф пробу вещества, по которому следует определить  $N$ , или смеси, содержащей это вещество. Допускается использовать анализируемую смесь. Характеристики чувствительности и объем пробы выбирают таким образом, чтобы пик вещества, по которому определяют  $N$ , удовлетворял требованиям п. 8.2.1. Регистрируют пик вещества и измеряют с помощью линейки (погрешность не более 0,5 мм) расстояние  $l$  по ленте самописца от момента ввода пробы до выхода максимума пика (время удерживания) и с помощью измерительной лупы (погрешность не более 0,1 мм) ширину  $b$  на половине высоты.

Рассчитывают  $N$  колонки по данному веществу по формуле

$$N = 5,54 (l/b)^2.$$

7.3.2. Определение критерия разделения. Вводят в хроматограф смесь двух веществ, для которых необходимо определить критерий разделения, или смесь, содержащую оба этих вещества. Допускается использовать анализируемую смесь. Характеристики чувствительности и объем пробы выбирают так, чтобы пики веществ, для которых определяют критерий разделения, удовлетворяли требованиям п. 8.2.1.

Регистрируют пики этих веществ и измеряют линейкой (погрешность не более 0,5 мм) расстояние по ленте самописца между максимумами пиков ( $\Delta l$ ), а с помощью измерительной лупы (погрешность не более 0,1 мм) — ширину каждого из пиков ( $b_1$  и  $b_2$ ) на половине его высоты. Рассчитывают критерий разделения ( $K_1$ ) для данной пары по формуле:

$$K_1 = \Delta l / (b_1 + b_2).$$

7.4. Подготовка пробы.

7.4.1. Отбор проб производится в соответствии с ГОСТ 3885—73.

7.4.2. Условия отбора и подготовки проб должны исключать возможность изменения качественного и количественного состава анализируемого продукта.

7.4.3. Если для выполнения условия п. 7.4.2 необходимы какие-либо особые приемы или приспособления, то они должны быть описаны в методике анализа.

7.5. Определение параметров удерживания.

7.5.1. Параметры удерживания ( $t'_R$ ) компонентов анализируемой смеси (продукта) определяют по отношению либо ко времени удерживания основного компонента, либо ко времени удерживания внутреннего стандарта.

7.5.2. Для определения  $t'_R$  снимают хроматограмму анализируемой смеси или модельной смеси, близкой по составу к анализируемой, при условиях выполнения измерений. Если  $t'_R$  определяют по отношению к внутреннему стандарту, то следует ввести его в смесь.

Измеряют на хроматограмме неисправленные времена удерживания  $t_R$ , всех компонентов и рассчитывают для каждого компонента отношение неисправленных времен удерживания по формуле:

$$t'_R = t_{Ri} / t_{R_{см}},$$

где  $t_R$  — время удерживания основного компонента или внутреннего эталона.

Рекомендуется определить  $t'_R$  из трех хроматограмм, вычислить среднее арифметическое значение  $t'_R$  и представить их в форме таблицы.

7.5.3. Значения  $t'_R$  подлежат проверке после замены колонки и при изменении температуры анализа.

7.6. Определение градуировочных коэффициентов.

7.6.1. Градуировочные коэффициенты устанавливают на этапе разработки методики газохроматографического анализа, проверяют или устанавливают вновь на этапе освоения методики с применением конкретного хроматографа и периоди-

чески проверяют в процессе эксплуатации хроматографа в период выполнения анализов конкретного продукта.

7.6.2. Градуировочные коэффициенты устанавливают и проверяют по аттестованным смесям в условиях МВИ.

7.6.3. Аттестованные смеси готовят и аттестуют в соответствии с «Методикой приготовления смесей, применяемых для метрологической аттестации МВИ» по обязательному приложению 2 к ГОСТ 8.505—84 (см. предыдущее Приложение).

7.6.4. Аттестованные смеси для определения градуировочных коэффициентов следует готовить из веществ, идентифицированных как компоненты анализируемого продукта. Аттестованная смесь должна иметь количественный состав, близкий к составу анализируемого продукта.

7.6.5. При невозможности идентификации того или иного компонента анализируемого продукта или при отсутствии в лаборатории образца того или иного идентифицированного компонента допускается: а) использование для приготовления аттестованной смеси другого вещества аналогичного класса соединений с близким к компоненту временем удерживания; б) введение в аттестованную смесь вместо неидентифицированного компонента основного анализируемого вещества (при работе по методу внутреннего стандарта); в) при невозможности выполнения пунктов «а» или «б» определение градуировочного коэффициента по литературным данным или путем теоретического расчета.

7.6.6. Для установления градуировочных коэффициентов снимают на том же хроматографе, на котором будет анализироваться продукт, в условиях анализа продукта пять хроматограмм аттестованной смеси и из каждой хроматограммы рассчитывают значение градуировочного коэффициента  $K_{i,j}$  для каждого компонента смеси по отношению к внутреннему стандарту по формуле:

$$K_{ij} = m_i S_{стj} / (m_{ст} S_{ij}),$$

где  $m$  — масса, взятая для приготовления аттестованной смеси, г;  $S$  — площадь пика, определяемая по п. 9.2.1 или считываемая с ленты интегратора, мм<sup>2</sup>; индекс  $i$  относится к компоненту, индекс «ст» — к внутреннему стандарту, индекс  $j$  — к порядковому номеру хроматограммы.

Вычисляют среднеизмеренную величину  $\bar{K}$ .

7.6.7. За результат измерения градуировочного коэффициента принимают среднее арифметическое результатов пяти наблюдений, относительное значение расхождения между наиболее различающимися значениями которых ( $d'$ ) не превышает значения допускаемого расхождения  $d$  (в %), установленного на стадии метрологической аттестации.

Пределы допускаемого значения относительной суммарной погрешности результата измерения градуировочных коэффициентов составляют  $\pm \Delta_K$  при доверительной вероятности  $P=0,95$  ( $\Delta_K$  устанавливают также на стадии метрологической аттестации). Результат измерения градуировочного коэффициента представляют в форме:

$$\bar{K}_i \pm \Delta_K.$$

Если  $d' > d$ , то  $\Delta_K$  устанавливают вновь.

7.6.8. Значения  $K_i$  подлежат проверке: при переходе на другой хроматограф; при возобновлении работы по анализам данного продукта после перерыва; после ремонта узлов хроматографа, влияющих на детектирование (детектор, усилитель, аттенюатор, самописец, перенастройка систем подачи водорода и воздуха в детектор ионизации в пламени и т. п.).

7.6.8. Рекомендуется представлять установленные значения  $K_i$  в форме таблицы вместе с величинами  $t_R$ .

## 8. Выполнение измерений

8.1. Взятие навесок.

8.1.1. При взятии навесок соблюдать требование п. 7.4.2.

8.1.2. Навески жидких проб отбирают в чистую сухую тару с самоуплотняющейся крышкой с помощью пипетки с делениями или медицинских шприцов, не имеющих уплотнительных деталей из силиконовой резины. При использовании в ка-

честве тары флаконов с резиновыми пробками (типа пенициллиновых) под пробку следует подкладывать фторопластовую пленку

8 1 3 При введении в пробу внутреннего стандарта навески пробы и материала внутреннего стандарта следует брать на аналитических весах с погрешностью не более 0,0002 г. Ни одна из навесок не должна иметь массу менее 40 мг

#### 8 2 Требования к хроматограммам

8 2 1 При выполнении газохроматографических измерений с регистрацией пиков на ленте самописца и измерением параметров пиков вручную характеристики чувствительности, объем пробы, количество внутреннего стандарта и скорость ленты самописца следует выбирать так, чтобы пик внутреннего стандарта имел высоту не менее 50 мм и ширину на половине высоты не менее 10 мм. Пики основных примесей, определяющих качество продукта, по порядку значений высоты и ширины на половине высоты должны быть сравнимы с пиком внутреннего стандарта

8 2 2 Допускается переключение характеристик чувствительности при регистрации хроматограммы с целью выполнения требований п 8 2 1. Значения коэффициентов аттенюирования после каждого их изменения следует отмечать на хроматограмме

8 2 3 Количество хроматограмм для каждого анализа — не менее двух

### 9. Вычисление результата измерений

#### 9 1 Измерение параметров пиков

9 1 1 При отсутствии в методике анализа специальных указаний о способе измерения параметров пиков измеряют высоту пика от нулевой (базовой) линии в направлении, перпендикулярном оси времени, с помощью линейки с погрешностью не более 0,5 мм. Затем измеряют ширину пика на половине высоты с помощью измерительной лупы с погрешностью не более 0,1 мм. При измерении принимают в расчет ширину линии, очерчивающей пик, для чего измеряют ширину пика от внешней кромки линии, очерчивающей одну границу пика (например, переднюю), до внутренней кромки линии, очерчивающей вторую границу пика

9 1 2 При измерениях параметров, не полностью разделенных или искаженных пиков, следует руководствоваться указаниями, приведенными в методике анализа

#### 9 2 Обработка результатов

9 2 1 Находят значение площади пика путем умножения его высоты на ширину на половине высоты либо считывают значение площади пика с ленты интегрирующего устройства

9 2 2 Рассчитывают из каждой хроматограммы массовую долю каждой примеси (компонента) по формулам (1) для метода внутреннего стандарта или (2) для метода внутренней нормализации

$$X_i = S m_{ct} K_i \cdot 100 / (S_{ct} m_{пр}), \quad (1)$$

$$X_k = S_k K_k A_k \cdot 100 / \left( \sum_{i=1}^N S_i K_i A_i \right), \quad (2)$$

где  $X$  — массовая доля примеси (компонента) в анализируемом продукте, %;  $S$  — площадь пика примеси (компонента), мм<sup>2</sup>;  $S_{ct}$  — площадь пика внутреннего стандарта, мм<sup>2</sup>;  $K$  — градуировочный коэффициент, найденный по п 7 6;  $A$  — коэффициент аттенюирования;  $m_{ct}$  — масса навески внутреннего стандарта, г;  $m_{пр}$  — масса навески пробы анализируемого продукта, г;  $N$  — число примесей (компонентов), регистрируемых на хроматограмме

#### 9 3 Представление результатов

9 3 1 За результат анализа принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, расхождение между которыми не превышает значения допускаемого расхождения  $d$ , установленного нормами точности измерений. Если это условие не выполняется, то измерение повторяют для исключения грубых промахов

Пределы допускаемого значения суммарной погрешности результата анализа составляют  $\pm \Delta_X$  при доверительной вероятности  $P=0,95$

Показатели точности измерений могут выражаться как в абсолютной, так и в относительной форме

9.3.2 В зависимости от конкретных требований к анализу результаты измерений могут быть представлены в одной из следующих форм в виде указания суммарной массовой доли примесей в процентах и допускаемого значения суммарной погрешности результата анализа при доверительной вероятности  $P$  например,

сумма хроматографируемых примесей  $(\sum_{i=1}^N X_i \pm \Delta_X \%)$ ,  $P=0,95$ , в виде указания массовой доли одного нормируемого компонента или нескольких нормируемых компонентов и допускаемого значения суммарной погрешности результата (результатов) при доверительной вероятности  $P$ , например «массовая доля (наименование нормируемого компонента или компонентов)  $(X \pm \Delta_X) \%$ ,  $P=0,95$ »

9.3.3 Суммарную погрешность найденных значений массовых долей компонентов характеризуют величиной  $\pm \Delta_X$ , установленной при метрологической аттестации методики анализа

## 10. Контроль точности измерений

Для контроля точности измерений снимают в условиях анализа не менее трех хроматограмм аттестованной смеси, приготовленной по п 7.6.3—7.6.5. Рассчитывают из каждой хроматограммы значения массовых долей всех компонентов, используя установленные ранее значения градуировочных коэффициентов, в соответствии с п 9.2.2. Находят среднее арифметическое значение массовой доли каждого компонента. Сравнивают полученное значение с известным значением массовой доли компонента в аттестованной смеси. Расхождение не должно превышать значения предельной суммарной погрешности.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- 1 Poob S F, Schuette Sh A Contemporary practice of Chromatography Elsevier, 1984 708 p
- 2 Стыскин Е Л, Ицксон Л Б, Брауде Е В Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография М Химия 1986 288 с
- 3 Snyder L R, Kirkland J J Introduction to modern liquid chromatography 2nd ed New York Wiley Interscience, 1979 863 p
- 4 Шатц В Д, Сахартова О В Высокоэффективная жидкостная хроматография Основы теории Методология Применение в лекарственной химии Рига Зинатне, 1988 220 с
- 5 Фригц Дж, Гьерзе Д Г, Поланд К Ионная хроматография М Мир, 1984 224 с
- 6 Туркова Я Аффинная хроматография М Мир, 1980 471 с
- 7 Березкин В Г Газо-жидко-твердая хроматография М Химия
- 8 Сакодынский К И, Бражников В В и др Приборы для хроматографии 2-ое издание М Машиностроение 1987 262 с
- 9 Сакодынский К И, Панина Л И Полимерные сорбенты для хроматографии М Наука, 1976, 221 с
- 10 Киселев А В, Яшин Я И Адсорбционная газовая и жидкостная хроматография М Химия, 1979 288 с
- 11 Sakodynski K I M S Tswett Life and works Milano Ed Carbo Erba 1983
- 12 Цвет М С Хлорофиллы в растительном и животном мире Варшава Изд во Варшавского у та, 1911 214 с
- 13 Аэров М Э, Тодес О М, Наринский Д А Аппараты со стационарным зернистым слоем Л Химия 1979 175 с
- 14 Тимофеев Д П Кинетика адсорбции М Изд во АН СССР, 1962 252 с
- 15 Герасимов Я И и др Курс физической химии Т 1 М Химия 1963 523 с
- 16 Жуховицкий А А, Туркельтауб Н М Газовая хроматография М Гостоптехиздат, 1963 441 с
- 17 Гмурман В Е Теория вероятностей и математическая статистика М Высшая школа 1977 345 с
- 18 Giddings J C/Dynamics of chromatography Part 1 Principles and Theory New York Marcel Dekker Inc, 1965 323 p

- 19 *Столяров Б В, Савинов И М, Витенберг А Г* Руководство к практическим работам по газовой хроматографии Л Химия, 1988 335 с
- 20 Современное состояние жидкостной хроматографии/Под ред Дж Киркланд М Мир, 1974 325 с
- 21 Высокоэффективная тонкослойная хроматография/Под ред А Златкис, Р Кайзер М Мир, 1979 245 с
- 22 *Яшин Я И* // ЖВХО им Д И Менделеева 1983 Т 28 № 1 С 18—25
- 23 *De Ligny C L* // J Chromatogr 1970 V 49 N 3 P 393—401
- 24 *Руденко Б А* // Капиллярная хроматография М Наука, 1978 С 222
- 25 *Giddings J C* // Anal Chem 1962 V 34 N 34 P 722—725
- 26 *Said A S* / Separation sci and technology 1978 V 13 N 8 P 647—679
- 27 *Hinshaw J V, Feinstein P L* // American Lab 1983 N 9 P 116—124
- 28 *Jennings W, Mehran M F* // J Chromatogr Sci 1986 V 24 N 1 P 34—40
- 29 *Grob K, Grob K Jr* // J Chromatogr 1978 V 151 P 311—320
- 30 *Greter J, Shahle G* // Anal Chem 1982 V 54 N 7 P 1647—1650
- 31 *Grob K, Grob Jr K* // J Chromatogr Sci 1969 V 7 N 9 P 584—591
- 32 *Grob Jr K* // J Chromatogr 1983 V 279 N 1 P 225—232
- 33 *Grob K, Grob Jr K* // J HRC and CC 1978 V 1 P 57—64
- 34 *Grob K, Grob Jr K* // J Chromatogr 1978 V 151 N 1 P 311—320
- 35 *Schomburg G, Husmann H, Rittmann R* // J Chromatogr 1981 V 204 N 1 P 85—96
- 36 *Poy F, Visani S, Terrosi F* // J HRC and CC 1982 V 5 N 6 P 355—359
- 37 *Galli M, Trestuann S* // J Chromatogr 1981 V 203 N 1 P 193—205
- 38 *Бражников В В* // Дифференциальные детекторы для газовой хроматографии М Наука, 1974 223 с
- 39 *Бражников В В, Орлова В С, Субботин В П* // Исследование хроматографических процессов М НИИТЭХИМ, 1982 С 72—82
- 40 *Бражников В В, Орлова В С* Газовая хроматография М НИИТЭХИМ, 1985 С 15—20
- 41 *Бражников В В, Пошеманский В М, Сакодынский К И, Чернякин В Н* // Научные приборы М СЭВ, 1980, № 22 С 31—36
- 42 *Будович В Л, Шляхов А Ф* // Успехи химии М Наука, 1989 С 1354—1383
- 43 *Гуревич А Л, Русинов Л А, Сягаев Н А* // Автоматический хроматографический анализ Л Химия, 1982 192 с
- 44 *Пецев Н, Коцев Н* // Справочник по газовой хроматографии М Мир, 1987 260 с
- 45 Руководство по газовой хроматографии // Под ред Э Лейбница, Х Г Штруппе М Мир, 1988 Ч 1 479 с
- 46 *Фарзана Н Г, Илясов Л В, Азим-Заде А Ю* // Автоматические детекторы газов и жидкостей М Энергоиздат, 1983 185 с
- 47 *Ферапонтов В А, Бодрина Д Э* // Итоги науки и техники Сер Хроматография М ВИНТИ, 1978 С 107—122
- 48 *Руденко Б А* // Итоги науки и техники Сер Хроматография М ВИНТИ, 1980 С 78—135
- 49 *Березкин В Г, Алишоев В Р* // Итоги науки и техники Сер Хроматография М ВИНТИ, 1982 С 3—29
- 50 *Витенберг А Г, Иоффе Б В* // Газовая экстракция в хроматографическом анализе Л Химия, 1982 279 с
- 51 *Сотников Е Е, Волков С А* // Итоги науки и техники Сер Хроматография М ВИНТИ, 1982 С 103—140
- 52 *Смольянинов Г А, Филиппов Ю С, Зельвенский В Ю и др* // ЖАХ 1981 Т 36 № 2 С 342—349
- 53 *Смольянинов Г А, Зельвенский В Ю, Сакодынский К И* // ЖАХ 1981 Т 36 № 5 С 1250—1254
- 54 *Даль Ногаре, Джуветт* Газо-жидкостная хроматография М Недра, 1968 350 с
- 55 *Вигдергауз М С, Гольберт К П* Курс газовой хроматографии М Химия, 1967 400 с

57. *Lingeman H., Underberg W.*// J. Liq. Chromatogr. 1983. N 8. P. 789—821.
58. *Covey T. R., Lee E. D., Bruins A. P., Henion J. D.*// Anal. Chem. 1986. V. 58. N 14. P. 1451A—1460A.
59. *Bratin K., Blank C. L., Krull I. S., Lunte C. E., Shoup R. E.*// American Lab. 1984. N 5. P. 33—62.
60. *Бражников В. В., Якушина Л. М., Сянава Е. М., Карапетян Ш. А.*// Научные приборы. М.: СЭВ, 1981. № 14. С. 13—15.
61. *Беленький Б. Г., Ганкина Э. С., Мальцев В. Г.*// Капиллярная жидкостная хроматография. Л.: Наука, 1987. 206 с.
62. *Бражников В. В.*// Тезисы докладов на V Всесоюзном симпозиуме по молекулярной жидкостной хроматографии (г. Юрмала, 20—22 ноября 1990 г.). С. 268—269.
63. *Green R. B.*// Anal. Chem. 1983. V. 55. S. 20A—32A.
64. *Zare R. N.*// Science (Washington D. C.). 1984. V. 226. C. 298—303.
65. *Yeung E. S., Sepaniak M. J.*// Anal. Chem. 1980. V. 52. C. 1465A—1481A.
66. *Pfeffer W. D., Yeung E. S.*// Anal. Chem. 1986. V. 58. C. 2103—2105.
67. *Yeung E. S.*// Detectors for liq. chromatography. New York, Wiley, 1986. 250 p.
68. *Otten G.*// GIT. 1987. V. 31. N 8. P. 718—719.
69. *Scott R.P.W.*// Liq. Chromatography detectors., 2nd., Compl. rev. Amsterdam e.a.: Elsevier, 1986. 271 p.
70. *Abbott S. R., Tusa J.*// J. Liq. Chromatogr. 1983. V. 6. N 1. P. 77—104.
71. *Scott R.P.W.*// J. Chromatogr. Lib. 1986. V. 33. P. 7—47.
72. *Лерри С., Амос Р., Брюер Л.* Практическое руководство по жидкостной хроматографии. М.: Мир, 1974. 274 с.
73. *Imasaka T.*// J. Chromatogr. Lib. 1985. V. 30. P. 159—175.
74. *Gluckman J., Shelley D., Novotny M.*// J. Chromatogr. 1984. V. 317. C. 443—453.
75. *Гордон А., Форд Р.* Спутник химика. М.: Мир, 1976. 542 с.
76. *Рачинский Ф. Ю., Рачинская М. Ф.* Техника лабораторных работ. М.: Химия, 1982. 431 с.
77. *Colin H., Eon C., Guiochon G.*// J. Chromatogr. 1976. V. 122. N 1. P. 223—242.
78. *Snyder L. R.*// J. Chromatogr. 1974. V. 92. N 2. P. 223—230.
79. *Snyder L. R., Dolan J. W., Gant J. R.*// J. Chromatogr. 1979. V. 165. N 1. P. 3—30.
80. *Snyder L. R.*// J. Chromatogr. Sci. 1978. V. 16. N 6. P. 223—234.
81. *Hara S.*// J. Chromatogr. 1977. V. 137. P. 41—52.
82. *Tijssen R., Billiet H.A.H., Schoenmakers P. J.*// J. Chromatogr. 1976. V. 122. N 1. P. 185—203.
83. *Karger B. L., Snyder L. R., Eon C.*// J. Chromatogr. 1976. V. 125. N 1. P. 71—88.
84. *Glajch J. L., Kirkland J. J., Snyder L. R.*// J. Chromatogr. 1982. V. 238. N 2. P. 269.
85. *Glajch J. L., Kirkland J. J., Squire K. M., Minor J. M.*// J. Chromatogr. 1980. V. 199. N 1. P. 57.
86. *Cochrane R. A., Hillman D. E.*// J. Chromatogr. 1982. V. 241. N 1. P. 392—394.
87. *Small H.*// Anal. Chem. 1983. V. 55. P. 235A.
88. *Krull I. S., Selavka S. M., Duda C., Jacobs W.*// J. Liq. Chromatogr. 1985. V. 8. P. 2845—2870.
89. *Кастер Т. А., Нидервизер А.* Аминокислоты и олигопептиды. Хроматография. Практическое приложение метода. Ч. 1. М.: Мир, 1986. С. 37.
90. *Беленький Б. Г., Вилевич Л. Э.* Хроматография полимеров. М.: Наука. 1984. 403 с.
91. *Высокоэффективная тонкослойная хроматография* / Под ред. Златкис А., Кайзер Р. М.: Мир, 1979. 245 с.
92. *Беленький Б. Г., Ганкина Э. С., Нестеров В. В.* // ДАН СССР. 1967. Т. 172. № 1. С. 91—93.
93. *Куренбин О. И., Беленький Б. Г., Литвинова Л. С., Ганкина Э. С.* // ЖАХ. 1989. Т. 44. № 3. С. 493—502.

94. *Кирхнер Ю.* // Тонкослойная хроматография: Мир. 1981. 1139 с.
95. Handbook of Thin-Layer Chromatography / ed. Sherma J., Fried B.: Marcel Dekker, Inc., 1991. 1047 p.
96. *Nyiredy Sz., Dallenbach-Tölke K., Sticher O.* // J. Planar Chromatogr.-Modern TLC. 1988. V. 1. N 4. P. 336—342.
97. *Brinkman U.A.Th., De Vries G.* // Instrumental High Performance Thin-Layer Chromatography / ed. Kaiser R. E.: Inst. for Chromatography. 1982. P. 11—24.
98. *Tyihak E., Mincsovic E.* // J. Planar Chromatography-Modern TLC. 1988. V. 1. N 1. P. 6—19.
99. *Берёзкин В. Г., Бочков А. С.* // Количественная тонкослойная хроматография: Наука. 1980. 183 с.
100. *Новак И.* Количественный анализ методом газовой хроматографии. М.: Мир, 1978. 179 с.
101. *Шаевич А. Б.* Аналитическая служба как система. М.: Химия, 1981, 264 с.
102. *Дюерфель К.* Статистика в аналитической химии. М.: Мир, 1969, 173 с.
103. *Зайдель А. Н.* Погрешности измерения физических величин. Л.: Наука, 1985, 112 с.
104. *Чарыков А. К.* Математическая обработка результатов химического анализа. Л.: Химия, 1984, 168 с.
105. *Scanlon J. T., Willis D. E.* // J. Chromatogr. Sci. 1985. V. 23. N 8. P. 333—340.
106. *Кацнельсон М. Г., Мисник С. С.* // ЖАХ. 1976. Т. 31. № 5. С. 837—840.
107. *Вигдергауз М. С., Краузе И. М.* // ЖАХ. 1986. Т. 41. № 11. С. 2064—2074.
108. *Булатицкий К. К.* Высокоочищенные вещества. 1987. № 6. С. 173—178.
109. Требования к построению, содержанию и изложению документов, регламентирующих методики выполнения измерений содержаний компонентов проб веществ и материалов. ГОСТ 8.504—84. М.: Изд-во стандартов, 1984. 7 с.
110. Метрологическая аттестация методик выполнения измерений содержаний компонентов проб вещества и материалов. ГОСТ 8.505—84. М.: Изд-во стандартов. 1984. 16 с.
111. *Шаевич А. Б.* Стандартные образцы для аналитических целей. М.: Химия, 1987. 184 с.

Научное издание

**Сакодинский Карл Иванович, Бражников Вадим Васильевич  
Волков Сергей Андреевич, Зельвенский Валерий Юльевич  
Ганкина Эмилия Савельевна, Матц Виктор Давидович**

## **АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ**

**Редактор В.Л. Абрамова, Художник С.С. Водичи  
Художественный редактор В.И. Киселева  
Технический редактор Л.Н. Богданова  
Корректоры Н.Б. Желтова, М.А. Ивлиева  
ИБ 2479**

Сдано в наб. 11.04.91. Подп. в печать 03.12.92. Формат бумаги 60×88 1/16. Бумага тип. № 2  
Печать офсетная. Гарнитура литературная. Усл.печ.л. 28,42. Усл. кр.-отт. 28,42

Уч.-изд. л. 318. Тираж 3000 экз. Заказ № 989. С. 55

Диапозитивы изготовлены на Саратовском ордена Трудового Красного Знамени  
полиграфическом комбинате Министерства печати и информации Российской Федерации  
410004. Саратов, ул. Чернышевского, 59

Отпечатано с готовых пленок Московской типографией № 11  
Министерства печати и информации Российской Федерации  
113105. Москва, Нагатинская ул., д. 1

# **МОСКОВСКИЙ ЗАВОД «ХРОМАТОГРАФ» И ЕГО ДИСТРИБЬЮТОР А/О «АНАЛИТМАРКЕТИНГ»**

## **АНАЛИЗ — ДЕЛО ТОНКОЕ!**

А хроматографический анализ — вдвойне! Только умелое сочетание прибора и методики его применения принесут необходимые результаты!

Такой прибор есть! Это газожидкостной хроматограф модели 3700, хорошо зарекомендовавший себя в лабораториях США, он сегодня работает и на Вас.

Оригинальная конструкция, удобство в работе, высокий технический уровень плюс удачно подобранные методики, разработку которых Вы можете доверить нам, откроет Вам неограниченные возможности этого прибора.

Одновременная установка 3-х детекторов, отличающихся максимальной чувствительностью, высокой стабильностью и надежностью, работа на 4-х колонках, большой термостат и, кроме того, устройство программирования температуры его нагрева — это то малое, которое говорит о многом!

Многие лаборатории химической, нефтехимической, фармакологической и других отраслей промышленности, сельского хозяйства, медицины, охраны окружающей среды перешли на наш хроматограф и не жалеют об этом.

Вам может понравиться и наш переносной хроматограф ХМП-4, и тогда он станет Вашим помощником в передвижных лабораториях. Выполненный в виде переносного блока, включающего баллон с водородом и гелием, устройство непрерывного отбора пробы из воздуха, термостат с разделительными колонками, два детектора и микропроцессорный блок обработки результатов и управления, которые все вместе взятые едва ли весят более 11 кг, он может быть использован как прибор широкого назначения.

Необходимые методики работы с таким прибором закажите нам, и Вам не придется тратить на это дорогое время!

А со второй половины 1992 г. мы готовы будем поставить Вам более совершенную модель хроматографа — ХМП-5.

ХМП-5 — это лаборатория, которая всегда с Вами! Это то, что необходимо всем: 5 сменных детекторов и устройства переключения колонок в процессе анализа; приставка равновесного пара и микропроцессорное устройство управления, обработки, отображения и хранения результатов анализа.

24 В и 15 кг.

Мы и наши приборы работаем на Вас!

Позвоните нам по тел. 355-01-38.

Пишите нам по адресу: 109429, Москва, ул. Верхние Поля, 24,  
А/О «Аналитмаркетинг».



**МПО «МАНОМЕТР»  
ПРЕДЛАГАЕТ ХРОМАТОГРАФ «АГАТ»  
С МИКРОПРОЦЕССОРНЫМ УПРАВЛЕНИЕМ**

В 1991 г. будут выпускаться три модели: с детектором по теплопроводности (ДТП), с детектором пламенно-ионизационным (ПИД) и с двумя сменными детекторами ДТП и ПИД. Все модели хроматографов включают микропроцессорный блок управления режимными параметрами анализатора.

В комплект поставки с 1992 г. может включаться интеллектуальное устройство сопряжения (УСИ) хроматографа и персональной ЭВМ, программное обеспечение ПЭВМ, обеспечивающее обработку и интерпретацию хроматографической информации.

УСИ обеспечивает прием двух независимых аналоговых сигналов от хроматографов, преобразование аналоговых сигналов в цифровую форму с необходимым масштабированием, передачу в ПЭВМ хроматографической информации по последовательному каналу связи со стандартным интерфейсом RS-232-C. Диапазон изменения входных аналоговых сигналов 0—1В, динамический диапазон преобразования  $10^6$ , линейность 0,1%, скорость передачи до 9600 бод.

К УСИ могут быть подключены выходные сигналы от четырех одноканальных хроматографов с возможностью преобразования и передачи последовательно сигналов одной пары детекторов, а затем (после переключения) второй пары. Таким образом УСИ может обеспечивать передачу в ПЭВМ хроматографической информации от четырех хроматографов «Агат». Возможно также использование других имеющихся в эксплуатации у пользователя хроматографов с выходным аналоговым сигналом, изменяющимся в диапазоне 0—1В.

Для приема информации от УСИ и обработки могут использоваться ПЭВМ, совместимые с ЦВМ РС/ХТ, имеющие выход на последовательный канал связи RS-232-C, накопители на гибком и жестком магнитных дисках, память ОЗУ не менее 512 кБ, полноклавишную клавиатуру, дисплей и устройство печати.

Программное обеспечение ПЭВМ осуществляет обработку хроматографической информации в различных режимах:

градуировка измерительных каналов, поверка, анализ. В результате градуировки в памяти ПЭВМ создаются градуировочные таблицы, позволяющие в режиме анализа идентифицировать вещества анализируемых смесей, рассчитывать их концентрации различными методами, определять статистические оценки измерений. Текущие и запомненные хроматограммы могут быть представлены на видеотерминале, возможно редактирование графических изображений (изменение масштаба по уровню и времени, выкопировка части хроматограммы и т. п.). Протоколы анализов могут запоминаться, представляться на видеотерминале и устройстве печати. Запомненные хроматограммы могут многократно обрабатываться с измененными в результате директив пользователя параметрами обработки. Общение пользователя с комплексом осуществляется с помощью системы меню.

Кроме прикладного пакета программ обработки хроматограмм, поставляется системное программное обеспечение, турбосистемы языков высокого уровня, интегрированные пакеты программ создания дружелюбной среды, редакторов, баз данных. Таким образом, ПЭВМ может быть использована не только как обрабатывающий хроматограммы центр, но и самостоятельно для решения пользователем научно-технических задач.

Если пользователь не располагает требуемой ПЭВМ, то она может входить в комплект поставки. Ориентировочная стоимость ПЭВМ — 30 000 руб.

МПО «Манометр» обеспечит пусконаладочные работы программно-аппаратных комплексов, включающих хроматографы «Агат», УСИ и ПЭВМ. При выполнении указанных работ осуществляется аппаратная стыковка устройств комплекса, постановка программного обеспечения, наладка комплекса, обучение обслуживающего персонала работе с комплексом и прикладным программным обеспечением.

## **ПЛАЗМАХРОМ — ПЛАСТИНЫ ДЛЯ ОБРАЩЕННОФАЗНОЙ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

Пластины «Плазмахром» для тонкослойной хроматографии производятся по технологии, разработанной МПО «Манометр» совместно с ВНИИХромом.

Пластины успешно апробированы и могут быть использованы для анализа аминокислот, их производных, липидов, полиядерных ароматических углеводородов, олигосахаридов, углеводов, антибиотиков, ряда лекарственных препаратов,

наркотиков, пестицидов, промышленных олигомеров и полимеров, а также для контроля содержания вредных веществ в окружающей среде и пищевых продуктах.

В соответствии с разработкой в качестве исходного сырья используют пластины типа Сорбфил. В качестве сорбента применяют фракционный силикагель КСКГ и диаметром пор 110—130 Å, размером фракции 5—17 мкм (пластины для аналитической ТСХ—АТСХ) и 8—12 мкм (пластины для высокоэффективной ТСХ, ВЭТСХ). Толщина слоя сорбента 110—130 мкм. Согласно разработанной технологии толщина пленки 300—1000 Å.

Пластины «Плазмахром» обладают универсальностью — возможностью одновременного обнаружения широкого круга веществ. Пластины полностью готовы для применения; пригодны для работы с водно-спиртовыми смесями; размеры пластины оптимальны и занимают минимальную площадь при хранении и работе; благодаря эластичности подложки пластины безотходны при использовании (формат можно подрезать до желаемых размеров, при необходимости дополнительных исследований можно вырезать образцы из проявленных); тонкость и равномерность слоя обеспечивают высокое качество проводимых анализов; полимерная подложка не поддается воздействию обычных растворителей; технология разделения с использованием ТСХ пластин экономична, поскольку не требуется использование громоздкого и дорогостоящего оборудования.

#### Технические данные

Сорбент	Силикагель с привитой фазой СЗ
Зернение	5—17 мкм
УФ индикатор	254 нм
Размер	100 мм×100 мм
Количество	50 шт
Стоимость упаковки ориентировочно (50 шт. пластин размером 100 мм×100 мм)	175—200 руб

ВНИИХром предоставляет методическое обеспечение применения пластин «Плазмахром» и разрабатывает методики анализа конкретных объектов.

При заказе больших партий (~100 тыс. пластин) методическое обеспечение предоставляется бесплатно.

Гарантийные письма для заказа комплексов в составе:

1 Хроматографы «Агат» с необходимыми детекторами и микропроцессорными блоками управления, УСИ, программное обеспечение.

2. То же, что в п. 1, и ПЭВМ.

3 Пластины «Плазмахром»

направлять по адресу: Москва, 107120, ул. Новая Сыромятническая, 5/7, ВНИИХром, директору Хохлову В. Н., телефон для контактов 227—08—31, 297—79—44

**ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ  
ХРОМАТОГРАФИЯ (ВЭЖХ):  
КОЛОНКИ ГАРАНТИРОВАННОГО ВЫСОКОГО  
КАЧЕСТВА  
И ШИРОКИЙ АССОРТИМЕНТ ПРИНАДЛЕЖНОСТЕЙ И  
ХИМИКАТОВ  
ПРОИЗВОДИТ И ПОСТАВЛЯЕТ «Э Л С И К О»**

Обратившись к нам или нашим дилерам в Алма-Ате, Иркутске, Краснодаре, Нижнем Новгороде, Риге, Санкт-Петербурге, Таллине, Ташкенте, Харькове и других городах, в короткие сроки и за рубли Вы получите:

1. ВЭЖХ колонки для хроматографов импортного и отечественного производства (Милихромы всех модификаций и Цвет).

Диаметр колонок от 1 до 10 мм, длина до 300 мм, сорбенты 70 наименований для всех видов жидкостной хроматографии: обратно- и прямофазной, ионообменной, ион-парной, ионной, эксклюзионной. Каждая колонка имеет индивидуальную тест-хроматограмму и паспорт.

Стандартные колонки (обычно около 70% заказа) будут поставлены в течение 24-х часов со склада, остальные могут быть изготовлены срочно (в течение 3-х дней) или в обычном порядке (в течение 2-х недель).

2. Колонки нового типа ЭЛСИКАРТ для ВЭЖХ диаметром 2, 3 и 4 мм и длиной до 250 мм. Они имеют оригинальную конструкцию, удобны в работе и стоят дешевле обычных колонок почти в 1,5 раза.

3. Специальные концентрирующие колонки ЭЛСИКОН — они позволяют Вам при прямом вводе пробы надежно определять примеси при их содержании в пробе на 2—3 порядка ниже, чем без концентрирования.

4. Специальные защитные приспособления, увеличивающие срок работы Ваших дорогих (в том числе — импортных) колонок для ВЭЖХ в 2—4 раза: предколоночные фильтры, проточные фильтры, защитные колонки, насыщающие колонки, предколоночки, устройства для фильтрования элюента, устройства для фильтрования пробы, концентрирующие патроны.

5. Широкий ассортимент элементов для ВЭЖХ-систем: гайки, винты, конуса, капилляры нужной длины, петли для инжектора, соединители, тройники, входные фильтры, фриты и др. из нержавеющей стали, титана и циркония.

6. Конуса ЭЛСИФЕР II из полиимида для многократного подсоединения капилляров к различным устройствам, обеспечивающие герметичность при давлениях более 400 бар.

7. Демпферы пульсаций мембранного типа — обеспечивают снижение пульсаций потока растворителя и, соответственно, снижение уровня шума и повышение предела обнаружения в ВЭЖХ системах в 2—10 раз.

**8. Специальные наборы для конкретных применений и задач ВЭЖХ:**

**НИТРОХРОМ** (определение нитрата и нитрита), **КАТЕХОЛХРОМ** (для определения катехоламинов), **ВИТАХРОМ АЕ** (для определения витаминов А и Е в сыворотке крови или продуктах питания), **КАРОТИНХРОМ** (для определения каротина в сыворотке крови или продуктах питания), **ЭКОХРОМ-1** (для определения 9 приоритетных фенолов в водных средах), **ЭКОХРОМ-2** (для определения 13 приоритетных альдегидов и кетонов в воздушной среде), **ЭКОХРОМ-3** (для определения 14 приоритетных полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) в водной среде).

Каждый набор включает: ВЭЖХ колонку, патроны для отбора/концентрирования проб, стандарты, методику и рассчитан на 300—500 определений.

**9. Широкий ассортимент растворителей (включая ацетонитрил), ион-парных реагентов, стандартов и др. химикатов для ВЭЖХ.**

**10. Жидкостные хроматографы Милихром 4 (или 5) с их последующим запуском, обеспечением сервиса, методической помощью, обеспечением растворителями и колонками.**

**Ваши гарантийные письма на нашу продукцию направляйте по адресу:**

115478, Москва, ул. Москворечье, 5. ЭЛСИКО, директору Стыскину Е. Л.  
Телефоны: 324-12-95, 324-42-86, 324-98-95; Факс: 250-82-31.

## Московское представительство «НЕОЛАБ СРЛ» предлагает

### ГАЗОВЫЕ ХРОМАТОГРАФЫ

#### ГАЗОВЫЙ ХРОМАТОГРАФ СЕРИИ 8000

Этот хроматограф пришел на смену известному хроматографу ВЕГА. Газовый хроматограф серии 8000 сконструирован в соответствии с требованиями современных автоматизированных лабораторий, позволяет опеспечить решение многих аналитических задач, сэкономить лабораторную площадь, увеличить число производимых анализов, экономить текущие расходы. Прибор обеспечивает возможность выбора различных детекторов и капиллярных насадочных колонок, идеально отвечает требованиям эффективного проведения текущих анализов, обладает возможностями комбинирования различных детекторов и инжекторов и удовлетворяет большинству жестких требований исследовательских лабораторий.

Большая гибкость схемных решений в сочетании с простотой конструкторских решений позволяет расширить возможности вашей исходной системы. Высокое качество анализа обеспечено использованием выдающихся по характеристикам детекторов, инжекторов, автосамплеров и всевозможного дополнительного оборудования.

Основные особенности хроматографа серии 8000:

1. Простота работы. Удобная панель управления дает возможность оценивать состояние рабочего режима. Большой графопостроитель позволяет сразу получить первичную информацию.
2. Широкая возможность выбора функций программирования. Встроенные функциональные блоки обеспечивают автоматическое включение вентилей безделительного инжектора и вторичного наконечного охлаждения.
3. Обработка результатов измерений обеспечивается двоянным интерфейсом RS-232, присоединяющий интегратор, персональный компьютер и включение в общелaborаторную систему.
4. Оптимизированный модульный контроль пневматических блоков. Осуществлено независимое регулирование потоков газа-носителя и детекторных газов.
5. Удачная конструкция термостата. Термостат является ультрастабильным и обеспечивает достаточный объем для размещения двух насадочных колонок.
6. Выбор инжекторов для обеспечения количественного ввода. Новый делительно-безделительный инжектор обеспечивает ввод без потери тяжелых компонентов, холодный наконечный инжектор обеспечивает наивысшую точность ввода проб любой летучести. Имеется и мультиинжектор.
7. Робот-автосамплер обеспечивает ввод проб жидкости и равновесной паровой фазы, экономит время исследователя для творческой работы.

8. Легкая смена детекторов, обладающих высокой чувствительностью, нулевым мертвым объемом и возможностью замены за несколько секунд. В число детекторов входит и новый масс-детектор.

Другие особенности газового хроматографа следующие.

Для прибора характерно быстро и легко устанавливать программу работы при помощи клавишной панели с цифровой задачей параметров. Все обозначения знакомы хроматографисту, что помогает легко и быстро настраивать прибор с минимальным сроком обучения.

Для прибора характерен большой запас памяти, что позволяет хранить в памяти и запросить в любой момент данные. Это повышает производительность и обеспечивает хорошую воспроизводимость.

Для подсоединения прибора требуется просто включить его в сеть. Сдвоенный интерфейс RS-238 обеспечивает обработку информации любыми способами по Вашему выбору. Дешевый интегратор позволяет осуществлять контроль работы приборов и автосамплера и вести запись на регистраторе всех параметров.

Оптимизированы пневматические узлы и блоки регулирования газовых потоков, нет нужды в дополнительных средствах контроля расхода. На каждом манометре двойная шкала в Кра и Psi. При работе с детектором по захвату электронов обеспечивается оптимизация потока для него. Все компоненты газовых схем изготовлены из металла.

Все данные читаются на передней панели. Пневматические узлы расположены в отдельном блоке, защищенном от колебаний температуры.

Термостат позволяет работать при температуре до 450°C, начиная от -99°C или от -50°C. Быстрая установка заданной температуры, обеспечивает хорошую воспроизводимость температуры при работе в изометрическом режиме и при программировании температуры с шагом до 0,1°C/мин.

В термостате можно реализовать многоколонные и многодетекторные системы с оптимизацией потоков газа по каждому каналу.

В хроматографе установлены оптимизированные системы ввода проб, все инжекторы позволяют работать с колонками любого типа, включая макрокапиллярные. Охлаждаемый наконечный инжектор обеспечивает истинно количественный хроматографический анализ, при этом можно вводить пробу объемом до 500 мкл и обеспечить анализ на уровне пикogramмов (ppt).

Автосамплер позволяет вводить не только пробы, но и калибровочные вещества, что обеспечивает количественный автоматизированный анализ.

Газовый хроматограф серии 8000 — новый шаг в развитии приборной аналитической хроматографии.

## ГАЗОВЫЙ ХРОМАТОГРАФ МЕГА 2

Все то, что написано выше о приборах серии 8000 в полной мере относится к газовому хроматографу МЕГА 2. Однако термостат этого прибора несколько больше по размерам, а сам прибор предназначен для использования с капиллярными колонками высокой эффективности.

Поскольку во все основные элементы хроматографической системы внесены существенные улучшения, можно говорить об этом приборе как о новой существенно измененной модели хроматографа по сравнению с прибором МЕГА 1. Результатом является выигрышная комбинация оригинальных решений и традиционной надежности прибора при определенном совершенствовании внешнего вида и конструктивных решений. МЕГА 2 имеет дополнительный блок управления программатора анализа для обеспечения возможности реализации многоколонной схемы анализа.

Что касается детекторов и других дополнительных узлов и блоков, то они одинаковы, унифицированы и являются общими для всех хроматографических систем.

## ДЕТЕКТОРЫ ДЛЯ ГАЗОВЫХ ХРОМАТОГРАФОВ

Детектор по теплопроводности (типа HWD-80). Минимально детектируемое количество  $1 \times 10^{-10}$  г/мл (по неону); чувствительность  $2 \times 10^6$  (мв мл/мг (по неону); линейность  $\pm 2\%$  для гептана, динамический диапазон  $10^4$ ; температура детектора от комнатной до  $390^\circ\text{C}$ .

Детектор пламенно-ионизационный (типа FID-80), чувствительность 0,015 клн/г; линейный диапазон лучше чем  $10^6$ ; минимально детектируемое количество  $3 \times 10^{-12}$  г/с (по пентану); рабочая температура  $300^\circ\text{C}$  со стандартной горелкой,  $450^\circ\text{C}$  с керамической горелкой по специальному заказу.

Термоионный детектор. Высокочувствительный, высокоселективный детектор с широким линейным диапазоном для определения азот- и фосфорсодержащих соединений; минимально детектируемое количество  $5 \times 10^{-14}$  г/с по метилпаратиону и  $2 \times 10^{-13}$  г/с по атразину; линейный динамический диапазон лучше, чем 10; коэффициент селективности N/C= $10^4$ , P/C= $10^5$ ; рабочая температура  $330^\circ\text{C}$  со стандартной горелкой,  $450^\circ\text{C}$  с керамической горелкой.

Детектор по захвату электронов. Включает ионизационную камеру, источник излучения  $^{63}\text{Ni}$ , низковольтный нагреватель и платиновый сенсор.

Линейный динамический диапазон выше чем  $1 \times 10^4$  (при работе в режиме постоянного тока); минимально детектируемое количество менее чем 0,1 пг линдана; объем ионизационной камеры 400 мкл; пределы рабочих температур  $330^\circ\text{C}$  с обычной ячейкой, для работы при температуре до  $390^\circ\text{C}$  необходимо заказывать специальный источник. Желателен фильтр для очистки от кислорода.

Пламенно-фотометрический детектор. В нем предусмотрена новая конструкция камеры сгорания, позволяющая увеличить отношения сигнала к шуму на порядок по сравнению с обычной конструкцией такого детектора. Конструкция детектора позволяет установить вторичный фотоумножитель. Устанавливаются два фильтра на 394 нм для серы и на 526 нм для фосфора. Линейный динамический диапазон по сере  $10^3$  и по фосфору  $10^4$ , минимально детектируемое количество по диацетиону  $5 \times 10^{-12}$  г S/с и  $2 \times 10^{-13}$  г P/с; селективность — S/углеводород  $10^3$ , P/углеводород  $10^6$ ; рабочая температура до  $350^\circ\text{C}$ .

Для каждого из детекторов предлагается свой блок питания с характеристиками, в максимальной мере обеспечивающими достижения наилучших показателей детектирующих систем. Предусмотрена возможность создания мультidetекторных систем различных конфигураций.

## УСТРОЙСТВА ДЛЯ ВВОДА ПРОБ

Во всех хроматографических системах предусмотрена возможность использования различных устройств ввода проб для капиллярных и насадочных колонок.

Холодный наконечный инжектор. Для капиллярных колонок нового типа с дифференцированным термическим профилем с возможностью его оптимизации для разных режимов ввода пробы. Новая конструкция позволяет полностью устранить дискриминацию тяжелых компонентов.

Инжектор для насадочных колонок позволяет осуществлять как прямой наконечный ввод, так и испарение образца. Позволяет наряду с насадочными колонками работать с макрокапиллярными колонками.

Предусмотрена возможность реализации многоинжекторных систем с использованием автоматизированного регулятора последовательности включения систем ввода, переключателей потоков в колонках и мультidetекторных систем.

Для всех типов приборов предлагаются устройства для автоматического ввода проб.



Автосамплер А200S предусматривает возможность введения автоматически до 200 проб. Минимальное количество образца 10 мкл/3 ввода пробы. Характеризуется превосходной воспроизводимостью ввода проб (32, 105, 200), программированием режима, предусматривающим автоматический ввод подряд с ручным одиночным вводом при необходимости, регулируемой частотой ввода, возможностью реализации до 9 программ ввода проб.

Автосамплер AS предназначен для холодного наколонного ввода жидких проб на 42 и 60 позиций. Типичная воспроизводимость ввода пробы 1%, степень загрязнения соседней пробой менее 0,3%.

Кроме того, к любому прибору могут быть поставлены следующие два устройства, расширяющие возможности анализа летучих веществ и паровой фазы: термодесорбер TSDAS 800 и автоматическое устройство ввода проб в газовый хроматограф с термической десорбцией модели TDAS 5000.

Автоматическое устройство ввода проб в газовый хроматограф с термической десорбцией модели TDAS 5000 позволяет проводить ввод проб, сорбированных на адсорбенте после термической десорбции в автоматическом режиме, проводить динамический хроматографический анализ равновесной паровой фазы.

Программируемое время термической десорбции, индивидуальный контроль температуры зоны в диапазоне от  $-140^{\circ}\text{C}$  до  $+400^{\circ}\text{C}$  позволяет реализовывать как автоматический, так и полуавтоматический режим ввода проб.

Высокая точность измерений обеспечивается нулевым «мертвым» объемом, термостатирования крана ввода пробы, точностью пневматических линий из кварцевого стекла.

Устройство имеет 8 различных программ для контроля всех параметров процесса и последовательности операций.

Возможен как прямой ввод термически десорбированных веществ (скорость нагрева до  $1500^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ ) в разделительную хроматографическую колонну, так и промежуточное намораживание (до 30 «холодных» ловушек) с последующим детектированием на универсальных или высокоселективных детекторах.

Термодесорбер предназначен для анализа проб воздушной или водной среды, сконцентрированных в специальные концентраторы в виде трубок, заполненных сорбентом. Термодесорбер состоит из печи с регулируемой температурой для десорбции до  $399^{\circ}\text{C}$ , автоматического коллектора для сбора трубок, электропневматической системы для автосамплера и ряда других блоков и устройств, включая запуск в нужный момент интегратора.

Автосамплер для отбора и ввода паровой фазы типа HS 800 состоит из хранилища для 32 сосудов вместимостью каждый 10 мл, устройства для поддержания заданной температуры сосудов в пределах  $40\text{—}150^{\circ}\text{C}$ , электрически нагреваемой печи на 6 позиций, устройства для регулирования объема вводимой пробы в пределах  $50\text{—}2500$  мкл с интервалом 10 мкл, автоматического устройства для регулирования момента отбора пробы и продолжительности ввода пробы, устройства для продувки инжектора и повышения температуры микрошприца, набора инжекторов для реализации различных режимов ввода проб в газовый хроматограф.

Устройство для продувки и сбора образцов предназначено для удаления газообразных веществ из образцов жидкостей (воды) и твердых тел продувкой через пробы инертного газа по методу EPA 502.2; 524.2; 601; 602; 5030; 8240; 8260 и имеет главной целью использование для анализа примесей в воде и почве. Состоит из мембран для хранения образца, заполненных стекловатой вместимостью  $5\text{—}25$  мл, автоматического устройства для продувки, улавливания образца и его десорбции, устройства для регулирования температуры ловушки от комнатной до  $400^{\circ}\text{C}$  (скорость подъема до  $200^{\circ}/\text{мин}$ ), нагреваемого соединителя и вентиля с регулированием температуры от комнатной до  $300^{\circ}\text{C}$ , микропроцессора для регулирования и регистрации всех параметров.

Кроме того, в комплект можно включить следующие устройства, расширяющие возможности проведения хроматографических измерений: пробоза-

борные вентили для отбора и ввода газовых проб, устройства для переключения колонок, устройства для анализа выделений из упаковочных материалов (модель 125), пиролизер для исследований твердых проб (модель 120), модуль для криостатирования (модель 820), устройство для измерения объема подачи жидкого азота к модели 820, устройство для сбора пробы при газовой экстракции, предназначенное для определения органических веществ в воде по методу Гроба.

## УСТРОЙСТВА ДЛЯ ОБРАБОТКИ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ

**Компьютинг-интегратор DP 700.** Одноканальный интегратор для газовой и жидкостной хроматографии с принтером (плоттером, дисплеем на жидких кристаллах на 128—512 килобайт). Пригоден для проведения всех необходимых расчетов в хроматографии (площадь пика в %, нормализация площадей, учет внешнего и внутреннего стандарта). Метрология измерений — средние значения, % относительного стандартного отклонения и др.

**Двухканальный интегратор DP 700** предназначен для использования в детекторных системах.

**Система CHROM—CARD** обеспечивает наилучшую обработку результатов измерений при простоте работы. Флоппи-диски на 3,5' и 5,25'. Все, что пожелает потребитель по установке режима работы прибора, установке параметров опыта, автоматической обработке измерений включается в меню и реализуется без всякого вмешательства потребителя. Все хроматограммы хранятся в памяти компьютера. Интерфейс может быть двухканальный и четырехканальный.

## **СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЕ ГАЗОВЫЕ ХРОМАТОГРАФЫ**

### **ГАЗОВЫЙ ХРОМАТОГРАФ С ГЕЛИЕВЫМ ДЕТЕКТОРОМ МОДЕЛИ 2700**

Фирма «Карло Эрба Струментационе» создала и поставляет уникальный газовый хроматограф с гелиевым детектором с супервысокой чувствительностью, пригодный для анализа примесей постоянных газов и легких углеводородов  $\text{ppb}$ .

Принцип работы такого детектора, в котором используются метастабильные атомы гелия, хорошо известен и технически реализован только в этом приборе. Поскольку энергия возбуждения всех веществ кроме  $\text{Ne}^*$  19,8 эВ превышает энергию возбуждения всех веществ кроме  $\text{Ne}$ , то при помощи этого детектора можно анализировать примеси любых веществ, в частности постоянных газов, для которых другого столь высокочувствительного детектора просто нет.

Объем камеры детектирования 50 мкл, источник излучения тритиевый на 200 милликюри, поток газа до 100 мл/мин, рабочая температура комнатная, источник питания обеспечивает напряжение 400-650 В, линейный динамический диапазон  $10^4$ , воспроизводимость лучше 1%. Колонка двойная, может работать при температуре до 350°C. Переключающий вентиль позволяет осуществлять работу в системе переключающихся колонок. Предусмотрен сосуд для экспоненциального разбавления с целью приготовления калибровочных газовых смесей.

Возможность реализации высокой чувствительности детектирования в решающей степени зависит от чистоты используемого в качестве газа-носителя гелия (не менее 99,999%).

В целом реализация высокой чувствительности детектирования сопряжена с некоторыми трудностями, требует высокого мастерства аналитика, но вполне достижима на этом хроматографе.

### **АНАЛИЗАТОР ОБЩЕГО СОДЕРЖАНИЯ ОРГАНИЧЕСКОГО УГЛЕРОДА МОДЕЛИ TSM 480**

Анализатор предназначен для автоматического определения общего содержания органического углерода в воде любого типа. Продукты органической природы сначала окисляются, затем преобразуются в метан, который определяется пламенно-ионизационным детектором с измерением содержания углерода.

В состав специализированного прибора входят вентиль автоматического забора образцов жидкости, пропорциональный насос на 8 линий, устройство

удаления неорганического углерода и сепаратор газ—жидкость, окислительно-восстановительный реактор с регулированием температуры, термостат с хроматографической колонкой, устройство регулирования и регистрации температуры и газовых потоков, пламенно-ионизационный детектор модели 14/ех, программатор анализа и др.

Технические данные: цикл анализа 5 мин, объем вводимой пробы 20, 50 и 100 мкл, расход образца 3 мл/мин, расход кислоты 0,5% HCl или 0,5% HNO<sub>3</sub> 1 мл/мин, калибровка стандартным раствором.

Измеряются ТС — общее содержание углерода, ТОС — общее содержание органического углерода, VOC — содержание углерода в летучих соединениях, чувствительность  $\leq 0,1$  ppm углерода, воспроизводимость — коэффициент вариации  $\pm 5\%$ , предел измерений 1—1000 ppm.

## АНАЛИЗАТОР ЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА МОДЕЛЬ 1108

Этот анализатор является первым в мировой практике анализатором элементного состава, который позволяет определять элементы CHNS/O из обычной пробы и является наиболее точной системой этого типа с максимальной простотой проведения измерений. Образцы исследуемых проб вводятся автосамплером в систему, в которую подаются кислород и гелий. Образец сжигается в динамическом режиме при температуре на катализаторе 1030°C и при 1800°C, в капсулах из олова подвергается окислению и восстановлению, а продукты реакций вводятся в газохроматографическую колонку, разделяются на N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, SO<sub>2</sub>, что позволяет автоматически рассчитывать элементный состав. Следовые количества серы определяют детектором по захвату электронов, а изотопный состав можно определить масс-детектором.

В состав прибора входит автосамплер на 42—196 проб, что при автоматической работе существенно снижает стоимость анализа и упрощает обслуживание прибора. В приборе нет движущихся частей, отсутствует деление потоков после реактора окисления — восстановления. Прибор включает три основные конфигурации: CHN—O — конфигурация позволяет анализировать содержание четырех элементов и легко позволяет определять содержание общего кислорода: CHN—O — конфигурация позволяет определять C, H, N, а O из второй пробы; CHN — конфигурация позволяет определять 3 элемента, определение кислорода требует установки печи сжигания при температуре 1060°C, катализатор — никель на угле. Сначала анализируют образовавшийся CO, а затем после окислительно-восстановительного реактора определяют другие элементы.

Объем исследуемого образца 0,1—100 мг, пределы измерения 0,01—100%, точность зависит от области измерений 0,3—10% (отн.), время обычного анализа от 3 до 10 мин. Обработка результатов осуществляется микропроцессором модели DP 200.

## АВТОМАТИЗИРОВАННЫЙ АНАЛИЗАТОР ИМИТИРОВАННОЙ ДИСТИЛЛЯЦИИ ТЯЖЕЛЫХ НЕФТЯНЫХ ФРАКЦИЙ МОДЕЛИ HT SIM—DIST

Прибор построен на базе высокотемпературного капиллярного газового хроматографа, снабженного специальной долгоживущей термически стабильной неполярной кварцевой колонкой, способной работать при температуре до 450°C, что позволяет получать кривую распределения температур кипения фракций химических продуктов с температурами кипения до 800°C. Уникальная конструкция термостата позволяет проводить нагрев со скоростью до 15°C/мин. Использование криогенной приставки позволяет начать анализ от температур -70°C.

Холодный наконечный инжектор исключает дискриминацию и термическое разложение образца. Использование автоматического пробоотборника и системы обработки данных на базе ПЭВМ полностью автоматизирует процесс анализа.

Специально разработанная колонна с диметилсилоксановой фазой, привитой к поверхности капилляра, позволяет реализовать рекордно высокую температуру опыта, что позволяет элюировать соединения до С-140.

Пламенно-ионизационный детектор в специальном исполнении и потенциостатический усилитель обеспечивают высокую линейность детектирования в динамическом диапазоне  $10^5$ , а специальная система, обеспечивающая строгое постоянство газового потока в процессе программирования температуры, позволяет добиться воспроизводимости лучше 1% по интегральной интенсивности и лучше 0,1% по временам удерживания.

Для анализа не требуется внутреннего стандарта, а калибровка осуществляется по стандартной смеси парафинов С-18—С-110, которая необходима не чаще 1 раза в 2 недели.

Обработка результатов основана на программе перерасчетов времен удерживания в температуры кипения и может быть установлена на ПЭВМ любого типа.

Прибор дает возможность осуществить полную характеристику мазутов, вакуумных и средних дистиллатов, смазочных масел, тяжелых остатков нефтей и других нефтепродуктов.

## ЖИДКОСТНЫЕ И КОМБИНИРОВАННЫЕ ХРОМАТОГРАФЫ

### МИКРОКОЛОНОЧНЫЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФ «ФЕНИКС»

В этом хроматографе реализована ВЭЖХ на капиллярных кварцевых (0,25—0,32 мм) и стальных капиллярных (1—2 мм) колонках. Поток подвижной фазы в изократическом и градиентном движении регулируется в широких пределах. Благодаря использованию микроколонок с их более высокой проницаемостью можно применять колонки большей длины и, соответственно, большей суммарной эффективностью. Кроме того, можно использовать частицы  $3\mu$ , что способствует увеличению эффективности колонки. Одновременно удается повысить и реализуемую чувствительность обычно используемых в ВЭЖХ концентрационных детекторов вследствие фактического уменьшения разбавления образца при низких расходах подвижной фазы.

Поскольку расход подвижной фазы примерно в 200 раз меньше, возможна не только существенная экономия дорогостоящих растворителей, но и использование экзотических подвижных фаз. Появляется возможность проведения анализов с очень высокими скоростями вплоть до нескольких секунд. В ряде случаев при таких потоках удается использовать и газохроматографические детекторы с их уникальной селективностью.

Микроколоночная хроматография характеризуется более высокой массовой чувствительностью по сравнению с обычной ВЭЖХ, поэтому особенно интересна для биотехнологии и медицины, когда нередко лимитируется количество самого образца.

В хроматографе «ФЕНИКС 20» используют шприцовый безпульсационный насос, расход которого регулируется микропроцессором в пределах от 1 до 4 мкл/мин. Имеющиеся 3 насоса позволяют реализовать подачу бинарных, тройных и четверных смесей растворителей по задаваемой программе. Расход, давление и состав подвижной фазы и любая комбинация этих параметров могут быть установлены при помощи системы управления прибором. Нужный состав элюента получается в камере смешения, обеспечивающей высокую точность и воспроизводимость заданного состава. Подача дополнительного объема в шприцевой насос производится автоматически. Насос можно термостатировать, что позволяет работать с очень летучими растворителями и при очень низких расходах подвижной фазы.

Установка всех параметров режима работы в хроматографе «ФЕНИКС 20» очень проста и производится набором цифровых значений на передней панели микропроцессора. Ввод пробы объемом до 60 нл может быть осуществлен микроинжектором.

В качестве детектора используют спектральный проточный УФ-детектор с переменной длиной волны от 190 до 800 нм. В детекторе устанавливается

одна из 3 проточных микроячеек нового типа для капиллярных, макрокапиллярных и обычных колонок. Длину волны можно установить в любой области, а кроме того, можно провести измерения при двух длинах волн, так чтобы каждое из используемых соединений детектировалось оптимальной для него областью с возможностью программирования точного времени проведения этого измерения.

Некоторые технические характеристики: воспроизводимость расхода подвижной фазы  $\pm 0,1\%$ , давление, создаваемое шприцевым насосом 0—50 мПа (0—400 бар), время заполнения насоса 4 с/мл, полоса детектирования 6 нм, точность установки длины волны  $\pm 1$  нм, лампы дейтериевая (140—395 нм) и вольфрамовая (365—800 нм), колонки диаметр  $\times$  длина (0,32 мм  $\times$  120 см) 0,7  $\times$  (10—30 см) 1 мм  $\times$  (10—30 см) 2 мм  $\times$  (4—20 см)

### КОМБИНИРОВАННЫЙ ГАЗОВЫЙ И ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФ «ДУАЛХРОМ 3000»

Этот прибор представляет собой комбинацию жидкостного высокоэффективного хроматографа и газового хроматографа высокого разрешения, специально разработанный для анализа наиболее сложных на сегодняшний день анализируемых систем. Предусмотрено, в частности, первоначальное разделение смеси методом ВЭЖХ, используя одно- или многоколоночную систему с выделением интересующих соединений с переводом выделенных фракций в газохроматографическую систему с капиллярными колонками, обеспечивающими высокоэффективное разделение вводимых фракций с высокочувствительным и селективным их детектированием.

«ДУАЛХРОМ 3000» — первый комбинированный прибор, реализующий достоинства обоих вариантов хроматографии. Высокая селективность метода ВЭЖХ позволяет выделять нужные фракции, очищать их от примесей и концентрировать некоторые вещества. Эти преимущества особенно очевидны при прямом соединении с газовым хроматографом высокого разрешения. Такой комбинированный прибор позволяет упростить анализ сложных объектов и снизить стоимость анализа. Весь анализ можно провести почти без всяких ручных операций, полностью в автоматическом режиме. Эффективность перевода веществ достигает 100%, а для проведения анализа сложных, зачастую уникальных по происхождению исследуемых объектов требуется минимальное количество вещества. Повышается также надежность идентификации по величинам удерживания, а в случае подсоединения масс-спектрометра QMD 1000 с учетом очистки образца полная надежность идентификации достигается в ходе одного опыта.

Описанный выше жидкостной хроматограф «ФЕНИКС 20» является первой частью всей системы. Сложный анализ может потребовать использования двух ВЭЖХ-колонок различной полярности и с различными растворителями. Такая операция может быть осуществлена при помощи 10-позиционного вентилля. Программа необходимых операций закладывается в компьютер. В память компьютера закладываются для хранения все хроматографические и спектральные данные об исследованных фракциях и соединениях.

В системе предусмотрено использование устройства для перевода пробы в газовый хроматограф методом полного испарения с поддержанием температуры, несколько более высокой чем температура испарения растворителя. Далее остаток вводится в систему отбора проб через кварцевый капилляр и дозируется микровентилем. Система перевода достаточно сложна, но надежна.

В газовом хроматографе можно установить любые описанные типы селективных детекторов и реализовать любые известные режимы работы с использованием любого типа колонок.

В системе «ДУАЛХРОМ 3000» особое значение приобретает программа

всего сложного анализа, ее составление и ввод в память вычислительно-управляющего компонента в виде сложного меню.

Преимущества системы «ДУАЛХРОМ 3000» следующие: использование метода ВЭЖХ для приготовления образца без утомительных и связанных с потерями операций, повышение производительности лабораторных исследований со снижением стоимости анализа с возможностью реализации полностью автоматизированного анализа, достижение небывалого уровня чувствительности за счет комбинации достоинств различных типов детекторов, повышение надежности идентификации и точности измерений за счет автоматизации всего цикла анализа использования разных вариантов хроматографии.

В качестве примера можно привести исследование состава масел и жиров в пище, определение атразина в воде, когда только такая комбинация хроматографов позволила надежно определить 15 ppm триазино в воде, ситостирола и ситостерололеат в оливковом масле и т.д.

Возможности прибора «ДУАЛХРОМ 3000» еще только приоткрываются.

### СУПЕРКРИТИЧЕСКИЙ ФЛЮИДНЫЙ ХРОМАТОГРАФ SFC 3000

Флюидную хроматографию следует рассматривать как идеальный мостик между газовой и жидкостной хроматографией. Предусмотрена комбинация достоинств конденсированной подвижной фазы и высокочувствительного и селективного газа хроматографического детектирования. Область применения флюидной хроматографии включает соединения, важные с точки зрения анализа объектов окружающей среды, науки о жизни, лекарственных препаратов.

Созданная модель флюидного хроматографа SFC 3000 позволяет использовать все существующие типы детекторов и их комбинации, осуществлять программируемые изменения плотности подвижной фазы, ее давления и расхода, положительного и отрицательного изменения температуры, создавать градиент свойств подвижной фазы, использовать капиллярные и микронасадочные колонки с любым типом инжекторов, включая мультиинжектор, работать в интервале температур от -50 до 450°C. Прибор пригоден для препаративных разделений.

На приборе можно осуществлять предварительное экстрагирование из образцов любого агрегатного состояния при суперкритических условиях и осуществить ввод полученного экстракта в хроматографическую систему. Имеются две модификации прибора. В одной из них предусмотрено экстрагирование из одной экстракционной ячейки. В другой модификации прибора предусмотрена возможность использования полностью автоматической экстракционной установки на шесть образцов.

Коллектор разделенных фракций позволяет реализовать вымораживание выделенного образца или сбор его в экстракционные ячейки с растворителем с использованием для вымораживания сухого льда или пониженной температуры соответственно.

Уникальный автосамплер позволяет вводить в хроматограф до 60 образцов автоматически. Весь режим работы задается в программаторе работы и все параметры контролируются и могут быть проверены в любой момент. Все измеряемые параметры могут считываться на дисплее. Замена колонок может быть осуществлена в считанные минуты без сброса давления в системе.

Созданный уникальный суперкритический флюидный хроматограф SFC 3000 позволяет исследователю решать задачи изучения сверхсложных систем с низким уровнем лабильности, особенно важные для науки о жизни.

### ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТР TRIO 1000

Компьютерно управляемый квадрупольный масс-селективный детектор, сопряженный с газо-жидкостным хроматографом модели TRIO 1000 предоставляет исследователю уникальную возможность разделения многокомпонентных смесей (двухфазная двухмерная хроматография) и детального анализа химической структуры компонентов с библиотечным масс-спектральным поиском и идентификацией веществ в «реальном» масштабе времени и диапазоне



масс от 2 до 1000 а.е. с уникальной скоростью сканирования до 6000 а.е./с и перестраиваемым разрешением в диапазоне масс от 2500 до 1000.

Высоковольтный (5 и 10 кВ) конверсионный диод с фотоэлектронным умножителем обеспечивает высокочувствительное (1 НГ метилстеарата S/N 100:1 при M/Z 298) стабильное во времени детектирование как положительно, так и отрицательно заряженных ионов.

Через интерфейс квадрупольный детектор сопрягается с газовым хроматографом путем соединения конца капиллярной колонки с источником ионов (программно задаваемая энергия ионизации электронным ударом или химическая ионизация как положительными, так и отрицательными ионами, прямой ввод пробы). Система фильтров практически исключает возможность загрязнения детектора пробой.

Библиотека масс-спектров содержит данные для 20—30 тысяч соединений.

Высокий вакуум обеспечивается высокопроизводительным турбомолекулярным насосом.

Интерфейс хроматографа обеспечивает возможность ввода и ионизации проб от термического плазменного ввода, испарения и бомбардировки тяжелыми атомами.

Описанная интегральная система существенно расширяет возможности традиционной хромато-масс-спектрометрии, позволяет решать сложнейшие задачи в области охраны окружающей среды, токсикологии и биомедицины, а также контроль качества продукции.

## **АВТОМАТИЗИРОВАННАЯ ЛАБОРАТОРИЯ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МИКРОСТРУКТУРНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ПОВЕРХНОСТЕЙ ТВЕРДЫХ ТЕЛ И КАТАЛИЗАТОРОВ**

Лаборатория построена на принципах газовой адсорбции и ртутной порозиметрии, она позволяет исследовать характеристики поверхностей в широком диапазоне значений радиусов пор (от размеров молекул газа до макропор радиусом 600 НМ).

Набор приставок, например Криптон, позволяет с помощью метода низкотемпературной адсорбции рассчитывать характеристики микроповерхностей, распределение пор по размерам из кривых гистерезиса изотерм адсорбции и десорбции.

Приставка для хемосорбции позволяет использовать как широкий набор инертных газов для изучения пористых структур (удельная поверхность, распределение пор по размерам) различных материалов (сорбенты, катализаторы, строительные материалы), так и активных газов для проведения хемосорбции в широком диапазоне давлений и температур (от  $-196^{\circ}\text{C}$  до  $+500^{\circ}\text{C}$ ) и определения химической (каталитической) активности различных материалов и их поверхностно-активных центров.

Использование системы обработки данных на базе ПЭВМ с фирменным интерфейсом и программным обеспечением, автоматического пробоотборника и ряда устройств максимально снижают роль оператора и увеличивают производительность анализов.

Использование термопрограммируемого квадрупольного масс-селективного анализатора в экспериментах по термической адсорбции—десорбции в модулируемых циклах интрузии/экструзии позволяет за непродолжительное время получить информацию о механизме физико-химических превращений, эффективности как катализаторов, так и носителей.

Только эта лаборатория позволяет получить уникально полную характеристику о структуре твердых тел, используемых в катализе, хроматографии и других областях науки и техники.

## АНАЛИЗАТОР ОКИСЛЯЕМОСТИ ТОПЛИВ O-FID

Он представляет собой первый в мировой практике специализированный прибор для селективного определения любых повышающих окисляемость соединений в современных топливах.

Нормы содержания свинца в топливах непрерывно снижаются. Использование оксигената с улучшением октанового числа заставило искать метод ускоренного селективного анализа этих соединений в сложных смесях типа газоллина. «Карло Эрба» впервые создала такой прибор с одиночной капиллярной колонкой без клапанов переключения.

Принцип работы заключается в том, что установлены после колонки два простых микрореактора — один крекинга, другой гидрогенизации. В первом реакторе процесс идет при 400—1400°C на Pt/Rd—капиллярной трубке, во втором на коротком капилляре, внутренние стенки которого покрыты оксидом алюминия с адсорбированным на нем никелевым катализатором превращают любые оксигенаты в метан, который немедленно определяется количественно стандартным пламенно-ионизационным детектором, тогда как любые углеводороды после реактора уже не регистрируются. Благодаря этому удаляются накладываются пики, вследствие чего индивидуальные оксигенаты регистрируются даже в том случае, если они присутствуют на уровне следов. Достижимая селективность лучше 10<sup>7</sup>.

Минимально детектируемое количество составляет 100 пг, линейный динамический диапазон 10<sup>5</sup>.

Благодаря простоте одноколонной схемы, отсутствия каких-либо клапанов измерения несложны, а общее время в большинстве случаев не превышает 10—15 мин. Сам анализ проводят в изотермическом режиме.

Можно использовать автосамплер на 60 проб, что улучшает воспроизводимость до двух процентов по площади пика и до 0,1% по времени удерживания.

Прибор можно использовать для определения антиоксидантов в топливах и природных продуктах.

Прибор O-FID реализован на базе хроматографа серии МЕГА и использует всю его микропроцессорную технику.

## ПРИБОРЫ ДРУГИХ ТИПОВ

Лабораторные приборы для научных исследований и рутинных анализов: атомно-адсорбционные спектрофотометры и инфракрасные Фурье-спектрометры.

Автоматические, полуавтоматические и ручные анализаторы контроля качества нефтепродуктов по нормам американского общества испытания материалов (ASTM) для определения: температуры вспышки в открытом и закрытом тигле; абсолютной и условной вязкости нефтепродуктов; фракционного состава темных и светлых нефтепродуктов; температур помутнения, предельной фильтруемости, застывания, кристаллизации, размягчения битумов, каплепадения смазок; давления насыщенных паров по Рейду; консистенции и механической прочности пластичных материалов; содержания солей и примесей в сырой нефти; кислотных, бромных, иодных чисел и кислотности; меркаптановой серы; содержания коррозионной агрессивности и стойкости.

## ПРИБОРЫ ДЛЯ КОНТРОЛЯ СОСТОЯНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Метеорологическая станция: тахогонианеометр, термогигрометр, атмосферное давление, телескопическая антенна, система сбора и обработки метеорологических данных.

Селективные анализаторы для экологического мониторинга: газовый хроматограф модели 1030A, газохроматографический анализатор с пламенно-ионизационным/электроннозахватным детектором модели 5550.

Калибровочные газовые смеси: газовые баллоны к автоматическим анализаторам, генераторы газов (чистого воздуха, водорода).

Система для отбора проб воздуха и определения содержания пыли: экологический пробоотборник EXPLORER, радиометрический прибор для определения концентрации пыли в воздухе в непрерывном режиме, устройство для непрерывного отбора проб экомониторинга.

Система сбора и обработки данных: блок-накопитель экспериментальных данных, 30-ти каналный аналого-цифровой регистратор, ПЭВМ IBM PC AT/386-25, RAM 4 Mb, HDD 120 Mb, VGA 8-ми цветной цифровой графопостроитель, пакет прикладных программ.

Экологическая станция: двухосный (4×4) автомобиль с 6-ти цилиндровым дизельным двигателем MERSEDES 814 DA; специальная операторская кабина, приспособленная для экстремальных климатических условий, лабораторная мебель, электронные весы, бытовой холодильник; система автономного электроснабжения; аналитические приборы по выбору.

Наш адрес: 121002, Москва, ул.Веснина, 7. Итало-Российская Торговая палата.

Телефон: (095) 241-62-17, 241-65-17, 241-82-48

Факс: (095) 230-24-14

Научно-методологический центр «НЕОЛАБ»: 119899, Москва, Ленинские горы, Химический факультет МГУ, кафедра, аналитической химии, тел. (095) 939-13-83, 939-25-79, 939-41-28

Необходимую помощь в налаживании контактов окажет Ассоциация хроматографистов им. М.С.Цвета.

107076, Москва, Богородский вал, 3, ИРЕА,  
тел.: 168-34-06.